



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Doctorado “Medicina, Sanidad y Producción Animal y Ciencia de los Alimentos”

“Resistencia a antibióticos y capacidad para formar *biofilm* en cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) y *Salmonella* de origen alimentario”

Memoria que presenta la Licenciada en Biología

Laura Buzón Durán

para optar al Grado de Doctora por la Universidad de León

Dirigida por:

Dr. Carlos Alonso Calleja

Profesor Titular del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

Dra. Rosa María Capita González

Profesora Titular del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

León, julio de 2017



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Doctorado “Medicina, Sanidad y Producción Animal y Ciencia de los Alimentos”

“Resistencia a antibióticos y capacidad para formar *biofilm* en cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) y *Salmonella* de origen alimentario”

“Antibiotic resistance and biofilm-forming ability of MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) and *Salmonella* strains of food origin”

Laura Buzón Durán

León, 2017

El trabajo recogido en la presente Memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en la Universidad de León y ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-29645 y RTA2014-00045-C03-02), la Junta de Castilla y León (LE013A10-2 y 2011/00139/001) y la Universidad de León (2015/00052).

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible”

Ray Bradbury (1920-2012)

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis Directores de Tesis, la Dra. Rosa Capita González y el Dr. Carlos Alonso Calleja, por la confianza, amistad y cariño depositados en mí, junto con el hecho de brindarme la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral, cuando esta “*locura*” se me pasó por la cabeza. Os agradezco vuestra perseverancia, seriedad y paciencia a la hora de ayudarme con este trabajo, siempre más llevadero gracias a vuestro sentido del humor.

Agradezco que el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León (ICTAL) haya sido el lugar donde realicé la mayor parte del trabajo experimental de la Tesis, ya que allí me he sentido como en casa gracias a todas y cada una de las personas que trabajan allí día a día, porque un simple “*buenos días*” escondido tras sonrisas y caras de sueño, poco a poco se fue convirtiendo en un “*buenos días, ¿cómo lo llevas Laura?*”, y así, consiguieron que me sintiese como una más, ayudándome con cualquier duda siempre con su mejor intención.

No podría estar más agradecida de haber tenido la posibilidad de luchar día tras día con el microscopio láser confocal de barrido, ubicado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (LTI), microscopio que al principio da muchísimo respeto, pero al que, con el paso del tiempo, terminé cogiendo mucho cariño.

Quisiera dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, por haberme ayudado, tanto económicamente como moralmente en esta etapa de mi vida, ya que, sin vosotros, mi sueño no podría haberse hecho realidad. Gracias por vuestro apoyo en esta decisión tan complicada.

Me gustaría agradecer a mis amigos el apoyo moral, imprescindible en esos momentos de bloqueo que todos los doctorandos sufrimos, y los momentos juntos, esenciales para el despeje de mi mente.

Todas y cada una de las personas aquí mencionadas, habéis conseguido, sin daros cuenta, que crezca tanto personal como profesionalmente, y sin vosotros no podría ser la persona que soy, por ello, la Tesis no es sólo mía, es nuestra.

Esta tesis se la dedico con todo mi amor y cariño a:

Mi Abuela Angelita

“Porque nos cuidas con amor aún desde el más allá,
entre los ángeles”

Mis Padres

“Por vuestro impresionante esfuerzo invirtiéndolo todo en este proyecto sin medir la rentabilidad que os aportó esta inversión, por confiar y creer en mí, por ser mis fans más fieles e incondicionales, y porque vuestro amor ha sido el combustible para conseguir lo que al principio parecía imposible”

Mi Familia

“Donde la vida comienza y el amor nunca termina, porque hacéis que todo valga la pena. Si pudiese elegir a mi familia, os elegiría otra vez”

Mi Prima Cristina

“Mi hermana, mi amiga y mi confidente. Porque estás a las duras y a las maduras, porque, aunque somos diferentes, el fondo es el mismo”

Mis Amigos

“La familia que elegí, por interpretar miradas, entender silencios, perdonar errores, guardar secretos, estar ahí, prevenir caídas y secar lágrimas. Gracias por ser mis ángeles, que me ayudáis a ponerme en pie cuando mis alas se han olvidado de volar”

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1. LA INDUSTRIA CÁRNICA	3
1.1. TENDENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE CARNE	3
1.1.1. <i>Producción de carne en el ámbito mundial</i>	3
1.1.2. <i>Producción de distintos tipos de carne por continentes</i>	3
1.1.3. <i>Tendencias en la producción de carne en la Unión Europea</i>	8
1.1.4. <i>Producción de carne en España en los últimos años</i>	9
1.1.5. <i>Comercio exterior de carne de España</i>	10
1.2. CONSUMO DE CARNE EN ESPAÑA.....	11
1.2.1. <i>Comparativa de la estructura del gasto en carne en España entre 2014 y 2015 por Comunidades Autónomas</i>	11
1.2.2. <i>Variación del consumo de carne en los hogares españoles</i>	14
1.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL CONSUMO DE CARNE DE AVE	16
1.3.1. <i>Peligros microbiológicos derivados del consumo de carne de ave</i>	17
1.3.2. <i>Ventajas del consumo de carne de ave respecto al consumo de otras carnes</i>	20
1.3.3. <i>Definiciones de carne y productos cárnicos</i>	22
1.3.4. <i>Normativa aplicable a la carne y productos cárnicos</i>	24
2. ANTIMICROBIANOS USADOS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS.....	28
2.1. ANTIBIÓTICOS.....	30
2.1.1. <i>Uso de antibióticos en animales productores de alimentos</i>	32
2.2. BIOCIDAS.....	35
2.2.1. <i>Uso de biocidas en la Industria Alimentaria</i>	35
2.2.2. <i>Biocidas de uso alimentario: hipoclorito sódico (HIP), fosfato trisódico (FTS) y cloruro de benzalconio (CB)</i>	40
2.2.3. <i>Adaptación de las bacterias a los biocidas: causas y consecuencias</i>	46
3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	52
3.1. HISTORIA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	52
3.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	52
3.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	54

3.3.1. Tipos de resistencia bacteriana a los antibióticos	58
3.4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EUROPA Y EN LA UNIÓN EUROPEA	64
3.4.1. Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en cepas procedentes de seres humanos.....	64
3.4.2. Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en cepas procedentes de carne de ave.....	66
3.4.3. Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en cepas procedentes de animales productores de alimentos.....	69
4. BIOPELÍCULAS MICROBIANAS O BIOFILMS.....	71
4.1. PROPIEDADES DE LOS <i>BIOFILMS</i>	72
4.1.1. Heterogeneidad fisiológica.....	72
4.1.2. Fenotipo del biofilm	73
4.1.3. Comunicación célula-célula durante el proceso de formación del biofilm.....	73
4.1.4. Capacidad adaptativa.....	73
4.1.5. Movimientos individuales y cooperativos de las bacterias.....	73
4.1.6. Intercambio génico	74
4.1.7. Ubicuidad	74
4.1.8. Propiedades físico-químicas	74
4.2. FORMACIÓN DE LOS <i>BIOFILMS</i>	75
4.3. <i>BIOFILMS</i> EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	78
4.3.1. Aspectos negativos de los biofilms.....	79
4.3.2. Aspectos positivos de los biofilms	83
4.4. <i>BIOFILMS</i> Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	83
4.5. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LOS <i>BIOFILMS</i>	85
OBJETIVOS	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
RESUMEN.....	105

CAPÍTULO I.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> EN DIFERENTES TIPOS DE PREPARADOS DE CARNE DE AVE.....	111
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	113
MATERIAL Y MÉTODOS.....	115
TOMA DE MUESTRAS.....	115
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	115
DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	116
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	117
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	118
CALIDAD MICROBIOLÓGICA.....	118
DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i>	122
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

CAPÍTULO II.

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE ESTAFILOCOCOS RESISTENTES A LA METICILINA (MRS) DE ORIGEN ALIMENTARIO: COMPARACIÓN DEL MÉTODO CLÁSICO DE DIFUSIÓN POR DISCO Y UN <i>TEST</i> MINIATURIZADO DISPONIBLE COMERCIALMENTE.....	129
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	131
MATERIAL Y MÉTODOS.....	132
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	134
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	134
COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE MRS.....	138
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141

CAPÍTULO III.

EFFECTO DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE BIOCIDAS SOBRE LA ARQUITECTURA Y VIABILIDAD DE LOS <i>BIOFILMS</i> PRODUCIDOS POR <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE A LA METICILINA (MRSA).....	143
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	145
MATERIAL Y MÉTODOS	148
CEPA Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	148
BIOCIDAS	148
DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS	148
EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES CRECIENTES SUBINHIBITORIAS DE LOS BIOCIDAS	149
ESTABILIDAD DE LOS CULTIVOS ADAPTADOS	149
ESTUDIO DE LOS <i>BIOFILMS</i>	149
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	151
RESULTADOS	152
ADAPTACIÓN DE MRSA A LOS BIOCIDAS	152
FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	152
VIABILIDAD BACTERIANA.....	160
DISCUSIÓN.....	161
ADAPTACIÓN DE MRSA A LOS BIOCIDAS	161
FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	161
VIABILIDAD BACTERIANA.....	163
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165

CAPÍTULO IV.

EFFECTO DE CONCENTRACIONES SUBLETALES DE BIOCIDAS EN LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES Y LA VIABILIDAD DE LOS <i>BIOFILMS</i> FORMADOS POR <i>Salmonella Typhimurium</i>	169
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	171
MATERIAL Y MÉTODOS	173
CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO	173

BIOCIDAS	173
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	173
ADAPTACIÓN A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LOS BIOCIDAS	174
ESTABILIDAD DE LOS CULTIVOS ADAPTADOS	174
ESTUDIO DE LOS <i>BIOFILMS</i>	174
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	176
RESULTADOS.....	177
ADAPTACIÓN A LOS BIOCIDAS	177
ARQUITECTURA DE LOS <i>BIOFILMS</i>	177
DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL <i>BIOFILM</i>	178
DISCUSIÓN	183
ADAPTACIÓN A LOS BIOCIDAS	183
ARQUITECTURA DE LOS <i>BIOFILMS</i>	183
DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL <i>BIOFILM</i>	187
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
CONCLUSIONES.....	191
ANEXO I. PUBLICACIONES.....	195
Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2017). Microbial loads and antibiotic resistance patterns of <i>Staphylococcus aureus</i> in different types of raw poultry-based meat preparations. <i>Poultry Science</i> , in press, http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex200	197
Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2017). Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) of food origin: A comparison of agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized test. <i>Food Microbiology</i> , submitted	215
Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. <i>Food Microbiology</i> 65 , 294-301	231
Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by <i>Salmonella</i> Typhimurium. <i>Foodborne Pathogens and Disease</i> 14 (6), 350-356.....	241

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de los principales compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria (OJEC, 1998; IFT, 2006; SCENIHR, 2009; EEA, 2010; Capita González, 2013)	29
Tabla 2. Evolución de la situación de los antibióticos promotores del crecimiento (APC) en Europa (adaptado de Edqvist & Pedersen, 2001; Cepero Briz, 2006)	34
Tabla 3. Tipos de biocidas (fuente: Real Decreto 1054/2002; BOE, 2002).....	35
Tabla 4. Principales características deseables de los desinfectantes (Maillard, 2016)	40
Tabla 5. Ventajas e inconvenientes del uso de hipoclorito sódico en procesos de limpieza y desinfección (Fukurazi, 2006; Chamakura <i>et al.</i> , 2011).....	41
Tabla 6. Mecanismos asociados con el incremento de la resistencia a biocidas y antibióticos de las bacterias en los <i>biofilms</i> (Capita & Alonso-Calleja, 2013).	58
Tabla 7. Microorganismos formadores de <i>biofilms</i> en la Industria Alimentaria	81
Tabla I.1. Medios de cultivo, tiempos y temperaturas de incubación y referencias usadas para realizar los análisis microbiológicos	116
Tabla I.2. Recuentos microbianos (\log_{10} ufc/g; media \pm STD) en preparados de carne de pollo crudos.....	120
Tabla II.1. Prevalencia de resistencia a antimicrobianos (%) en 30 cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) de origen alimentario.....	136
Tabla II.2. Patrones de resistencia a antibióticos en cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) de origen alimentario	137
Tabla II.3. Evaluación del sistema miniaturizado <i>Sensi Test Gram-positive</i> para determinar la susceptibilidad a antibióticos de cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) de origen alimentario	139
Tabla III.1. Valores de biovolumen (μm^3) en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) de los <i>biofilms</i> formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.	156

Índice de Tablas

Tabla III.2. Porcentajes de superficie cubierta (%) observados para los <i>biofilms</i> formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.....	156
Tabla III.3. Altura máxima (μm) observada para los <i>biofilms</i> formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.....	157
Tabla III.4. Valores de rugosidad observados para los <i>biofilms</i> formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.....	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de carne en el mundo desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).....	3
Figura 2. Producción de carne de porcino por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).....	4
Figura 3. Producción de carne de pollo por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).....	5
Figura 4. Producción de carne de vacuno por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).....	6
Figura 5. Producción de carne de ovino por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).....	7
Figura 6. Producción de carne de pavo por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).....	7
Figura 7. Producción de carne de caprino por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).....	8
Figura 8. Tendencias en la producción de carne en la Unión Europea (datos de FAOSTAT, 2017)	9
Figura 9. Producción de carne en España desde el año 2012 hasta el año 2015 (datos de MERCASA, 2017)	10
Figura 10. Comercio exterior en 2015 en España (datos de MAPAMA, 2016a, 2016b, 2017b, 2017c).....	11
Figura 11. Comparativa del gasto per cápita en carne de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017).....	12
Figura 12. Comparativa de la participación del gasto de la carne sobre el gasto total en alimentación de España por Comunidades Autónomas de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017).....	13

Figura 13. Comparativa de la media nacional del gasto en carne en España por Comunidades Autónomas de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017).....	14
Figura 14. Comparativa de la variación (%) del consumo de carne de febrero de 2017 respecto a febrero de 2016 en los hogares (datos de MAPAMA, 2017d)	15
Figura 15. Comparativa del consumo per cápita de carne en España por Comunidades Autónomas de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017)	16
Figura 16. Frecuencia de distribución de los agentes causantes de brotes de fuerte evidencia epidemiológica asociados con los vehículos alimentarios (incluyendo el agua) implicados en la Unión Europea, 2015 (adaptado de EFSA, 2016)	19
Figura 17. Tasa de contaminación bacteriana por fase de proceso de sacrificio (FAO, 2013).....	20
Figura 18. Beneficios del consumo de carne de pollo	21
Figura 19. Reacciones químicas que ocurren entre la materia orgánica y el hipoclorito sódico (adaptado de Estrela <i>et al.</i> , 2002)	42
Figura 20. Vías y mecanismos de resistencia en amonios cuaternarios (adaptado de Tezel & Pavlostathis, 2015).....	46
Figura 21. Lugar de acción y efecto de los biocidas en las células bacterianas (Pardo Hernández, 2014)	48
Figura 22. Presentación de cinco bombas de expulsión ubicadas en células bacterianas (Pardo Hernández, 2014).....	50
Figura 23. Representación del flujo de resistencia bacteriana (azul), antibióticos (rojo) y biocidas (verde) entre diferentes ambientes y áreas de uso (Pardo Hernández, 2014).....	51
Figura 24. Mecanismos de resistencia bacteriana frente a diferentes clases de antibióticos (adaptado de Yilmaz & Özcengiz, 2016.).....	60
Figura 25. Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias (adaptado de Furuya & Lowy, 2006)	61

Figura 26. Diseminación de resistencia a antibióticos en bacterias a través de seres humanos, poblaciones animales, alimentos y aguas residuales (adaptado de Kirbis & Krizman, 2015)	64
Figura 27. Proporción de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a la meticilina en 2011 (gráfica superior) y 2015 (gráfica inferior) en la Unión Europea (ECDC, 2016)	65
Figura 28. Proporción de cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Enteritidis y <i>Salmonella</i> spp. de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a tetraciclina, ácido nalidíxico, gentamicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, cefotaxima y ampicilina en 2014 en la Unión Europea (datos de EFSA, 2016).	66
Figura 29. Porcentaje de resistencia a antimicrobianos seleccionados en cepas de MRSA procedentes de alimentos y animales en 2014 (datos de EFSA, 2016).....	67
Figura 30. Frecuencia de distribución de aislamientos completamente susceptibles y resistentes desde uno a nueve de las clases de antimicrobianos usados en el <i>test</i> en diferentes países de la Unión Europea en 2014 (adaptado de EFSA, 2016).....	68
Figura 31. Proporciones de aislamientos completamente susceptibles, resistentes a una o dos clases de antimicrobianos y multirresistentes en los serovares de <i>Salmonella</i> aislados más comunes en la Unión Europea, 2014 (adaptado de EFSA, 2016).	69
Figura 32. Diagrama de Sankey de los 17 serovares de <i>Salmonella</i> más notificados, en especies animales y alimentos de origen animal, por fuente, UE, 2015 (adaptado de EFSA, 2016).	70
Figura 33. Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un <i>biofilm</i> sobre un sustrato (Díaz, 2011).....	75
Figura 34. Interacción de factores que influyen en la formación de <i>biofilms</i> , arquitectura y funcionalidad en la Industria Alimentaria (adaptado de Whitehead & Verran, 2015).	79
Figura I.1. Distribución, en base al número de antibióticos al que fueron resistentes, de las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de preparados de carne de ave.....	123

Figura I.2. Porcentaje de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia a cada uno de los antibióticos examinados.....	124
Figura II.1. Definición y cálculo de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo y coeficiente <i>kappa</i>	133
Figura III.1. Proyecciones tridimensionales de los <i>biofilms</i> de MRSA 48a bajo 16 condiciones diferentes, con las proyecciones virtuales de las sombras a la derecha, obtenidas con el microscopio láser confocal de barrido y el programa Imaris	154
Figura III.2. Biovolumen en el campo de observación (14.161 μm^2) de los <i>biofilms</i> formados por MRSA 48a en ausencia de biocidas (gráfica A) o en presencia de concentraciones subinhibitorias (CMI/2) de cloruro de benzalconio (gráfica B), fosfato trisódico (gráfica C) o hipoclorito sódico (gráfica D)	158
Figura III.3. Porcentaje de bacterias muertas en los <i>biofilms</i> de MRSA 48a observados con microscopía láser confocal de barrido (n=36).	160
Figura IV.1. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los <i>biofilms</i> formados por <i>Salmonella</i> Typhimurium S175 en ausencia de biocidas.	179
Figura IV.2. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los <i>biofilms</i> formados por <i>Salmonella</i> Typhimurium S175 en presencia de cloruro de benzalconio (CMI/2).	180
Figura IV.3. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los <i>biofilms</i> formados por <i>Salmonella</i> Typhimurium S175 en presencia de fosfato trisódico (CMI/2).	181
Figura IV.4. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los <i>biofilms</i> formados por <i>Salmonella</i> Typhimurium S175 en presencia de hipoclorito sódico (CMI/2).	182
Figura IV.5. Biovolumen de los <i>biofilms</i> formados por células de <i>Salmonella</i> Typhimurium S175 no expuestas a biocidas (gráfica A) o previamente expuestas a cloruro de benzalconio (gráfica B), fosfato trisodico (gráfica C) o hipoclorito sódico (gráfica D).	184

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición

APHA, *American Public Health Association* (Asociación Americana de Salud Pública, EE.UU.)

BOE, Boletín Oficial del Estado

B-P, *Baird-Parker*

BPF, Buenas Prácticas de Fabricación

CB, cloruro de benzalconio

CDC, *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, EE.UU.)

CIP, *cleaning-in-place*

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU.)

CLSM, *confocal laser scanning microscopy* (microscopio láser confocal de barrido)

CMI, concentración mínima inhibitoria

CNERNA-CNRS, *Centre National d'Études et Recommandations sur la Nutrition et l'Alimentation-Centre National de la Recherche Scientifique* (Centro Nacional de Estudios y Recomendaciones sobre la Nutrición y la Alimentación-Centro Nacional de la Investigación Científica, Francia)

DMSO, dimetilsulfóxido

ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades, Solna, Suecia)

EE.UU., Estados Unidos de América del Norte

EEA, *European Environment Agency*

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

EPHA, *European Public Health Alliance* (Alianza Europea de Salud Pública)

EPS, *extracellular polymeric substances* (sustancias poliméricas extracelulares)

Abreviaturas

ESVAC, *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (Vigilancia Europea del Consumo de Antimicrobianos Veterinarios)

EU, *European Union* (Unión Europea)

EUCAST, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos)

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

FDA, *US Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos, EE.UU.)

FTS, fosfato trisódico

GRAS, *Generally Recognized as Safe* (Generalmente Reconocido como Seguro, EE.UU.)

HIP, hipoclorito sódico

ICMSF, *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos)

IFST, *Institute of Food Science and Technology* (Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Reino Unido)

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

KAAs, *kanamycin aesculin azide agar* (agar kanamicina, esculina, azida sódica)

L+D, limpieza y desinfección

MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España)

MAPAMA, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (España)

MAV, microbiota aerobia viable

MDR, *multidrug-resistant* (multirresistente)

MERCASA, Mercados Centrales de Abastecimientos, S.A. (España)

MRS, *methicillin-resistant staphylococci* (estafilococos resistentes a la meticilina)

MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina)

OGYEA, *oxytetracycline glucose yeast extract agar* (agar oxitetraciclina, glucosa, extracto de levadura)

OIE, *Office International des Epizooties* (Oficina Internacional de Epizootias, Organización Mundial de Sanidad Animal, París, Francia)

OJEC, *Official Journal of the European Community* (Diario Oficial de la Comunidad Europea)

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

PCA, *plate count agar* (agar para recuento en placa)

PDR, *pandrug-resistant* (panresistente)

QAC, *quaternary ammonium compound* (compuesto de amonio cuaternario)

QS, *quorum sensing* (sistema de comunicación celular o autoinducción)

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

SDS, Secretaría Distrital de Salud de Bogotá (Colombia)

STD, *standard deviation* (desviación estándar)

TSA, *tryptone soya agar* (agar triptona de soja)

TSB, *tryptone soya broth* (caldo triptona de soja)

U.K., *United Kingdom* (Reino Unido)

UCP, unidad de corrección de población

ufc, unidades formadoras de colonias

USA, *United States of America* (Estados Unidos de América del Norte)

VRBA, *violet red bile agar* (agar cristal violeta, rojo neutro, sales biliares)

VRBGA, *violet red bile glucose agar* (agar cristal violeta, rojo neutro, sales biliares, glucosa)

WHO, *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza)

XDR, *extensively drug-resistant* (con resistencia de espectro extendido)

YP, yoduro de propidio

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. LA INDUSTRIA CÁRNICA

1.1. Tendencias en la producción de carne

1.1.1. Producción de carne en el ámbito mundial

La carne de cerdo es la más producida en el mundo (115,3 millones de toneladas), seguida de la carne de pollo (100,4 millones de toneladas) y de la carne de vacuno (64,7 millones de toneladas) (Figura 1); en estos tres tipos de carne la tendencia ha sido de un aumento de producción con el paso de los años, siendo la carne de pollo la que ha aumentado más su producción (un 6,8% de aumento en 2014 respecto a 2012). Las carnes de ovino, caprino y pavo se producen en cantidades mucho menores, siendo la carne de caprino la menos producida en el ámbito mundial (5,5 millones de toneladas) (FAOSTAT, 2017).

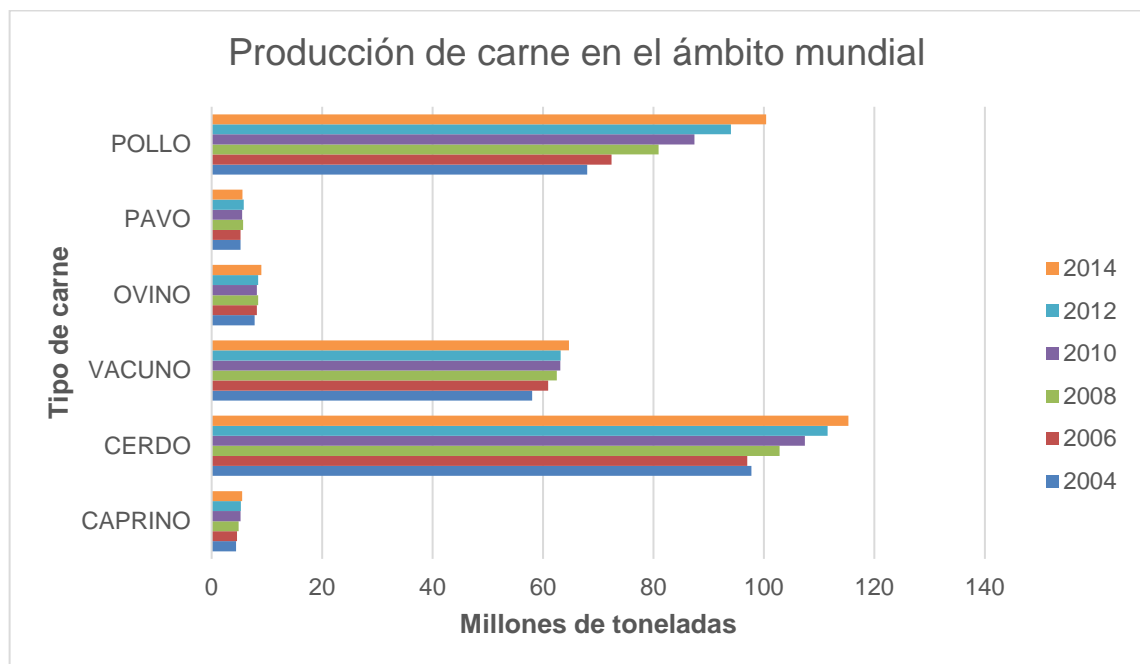


Figura 1. Producción de carne en el mundo desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).

1.1.2. Producción de distintos tipos de carne por continentes

En cuanto a la producción de los principales tipos de carne (porcino, pollo, vacuno, ovino, pavo y caprino), se observa una tendencia generalizada al aumento según

avanzan los años (Figuras 2-7). Esto puede ser debido al crecimiento demográfico y al aumento de los ingresos económicos, factores que provocan un incremento en la demanda de la carne (FAO, 2014b).

La carne de **porcino** es la más producida en el mundo, siendo Asia el continente que genera más cantidad (66,6 millones de toneladas), seguido de Europa (27,5 millones de toneladas). El continente que produce menos cantidad es Oceanía (0,5 millones de toneladas), cuya producción se ha mantenido constante a lo largo de los años. Asia es el continente en el que más ha ido aumentando la producción de forma gradual a lo largo de los años, produciéndose un aumento del 5,71% en la producción de 2014 respecto a la producción de 2012 (Figura 2).

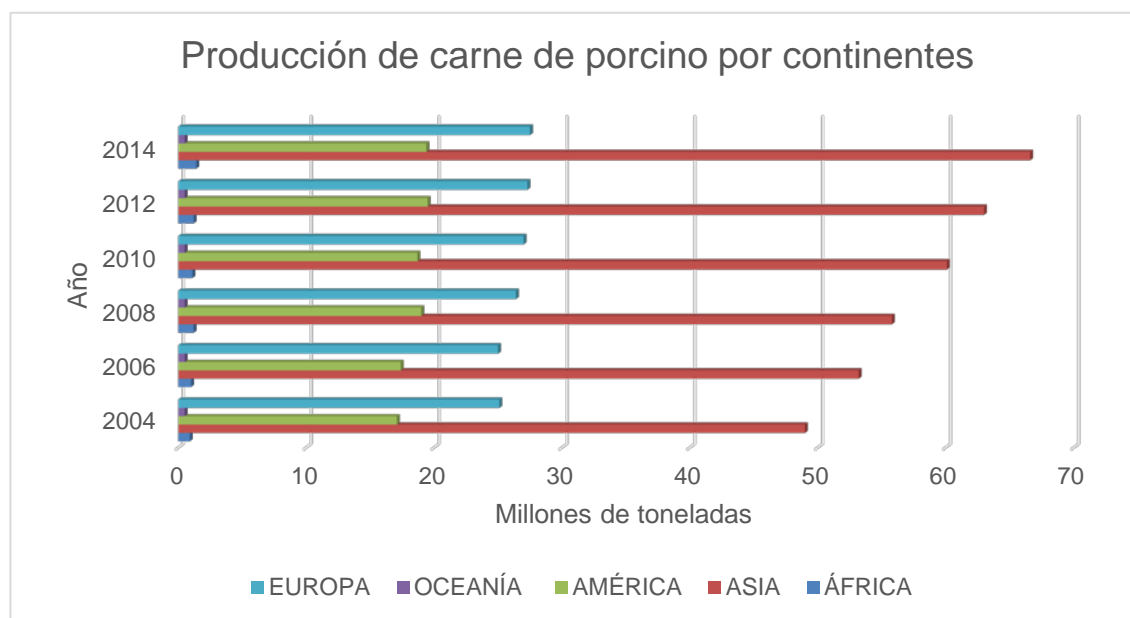


Figura 2. Producción de carne de porcino por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).

La carne de **pollo** es la segunda más producida, siendo América el continente más productor (42,6 millones de toneladas), seguido de Asia (34,4 millones de toneladas), encontrándose en tercer lugar Europa (16,7 millones de toneladas). En estos tres continentes se observa un aumento progresivo de la producción a lo largo del tiempo, mientras que en los continentes menos productores, África (0,2 millones de toneladas) y Oceanía (1,3 millones de toneladas), la producción de carne de pollo se ha mantenido estable a lo largo de los años. Europa es el continente en el que ha aumentado más la

producción de 2014 respecto a 2012, siendo este aumento del 8,4%; el incremento de la producción en este bienio fue de un 5,4% en América, el continente más productor de este tipo de carne (Figura 3).

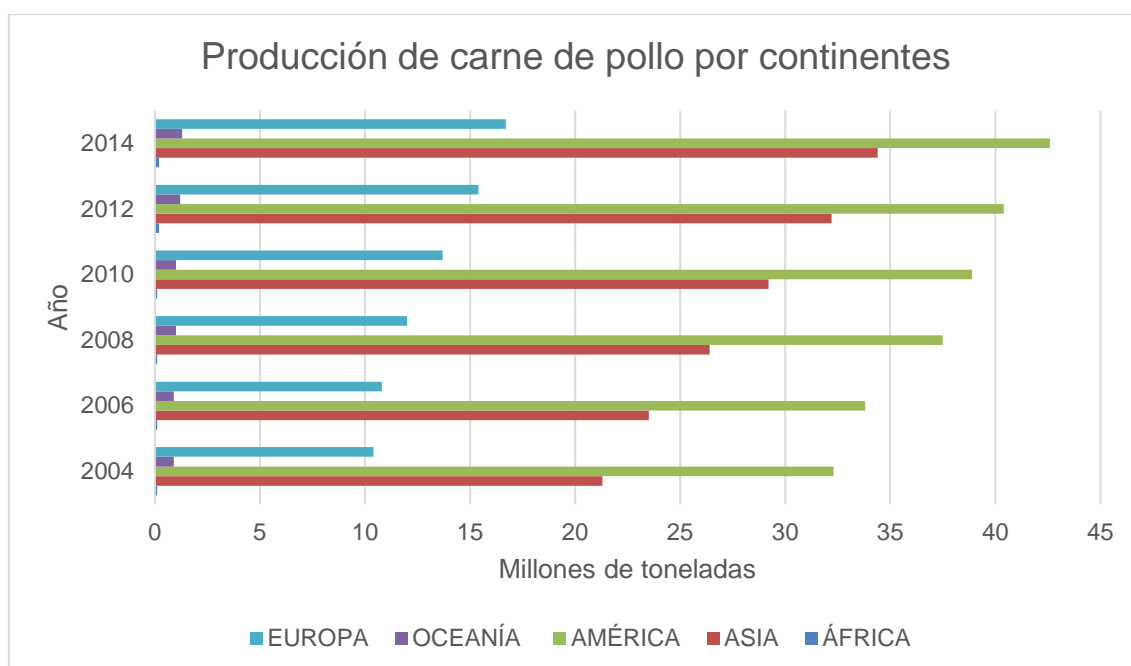


Figura 3. Producción de carne de pollo por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).

En relación con la carne de **vacuno**, señalar que el continente con menor producción es Oceanía (3,2 millones de toneladas), seguido de África (6,1 millones de toneladas), manteniéndose estos datos constantes a lo largo de los años. En 2014 América fue el continente que más carne de vacuno produjo (30,7 millones de toneladas), aumentando un 1% la producción en 2014 respecto a 2012. Aunque en 2004 Europa y Asia produjeron una cantidad similar de carne de vacuno, en Europa la tendencia ha sido mantenerse hasta 2010, disminuyendo en 2012; mientras que en Asia la tendencia ha sido hacia un aumento claro de la producción (Figura 4).

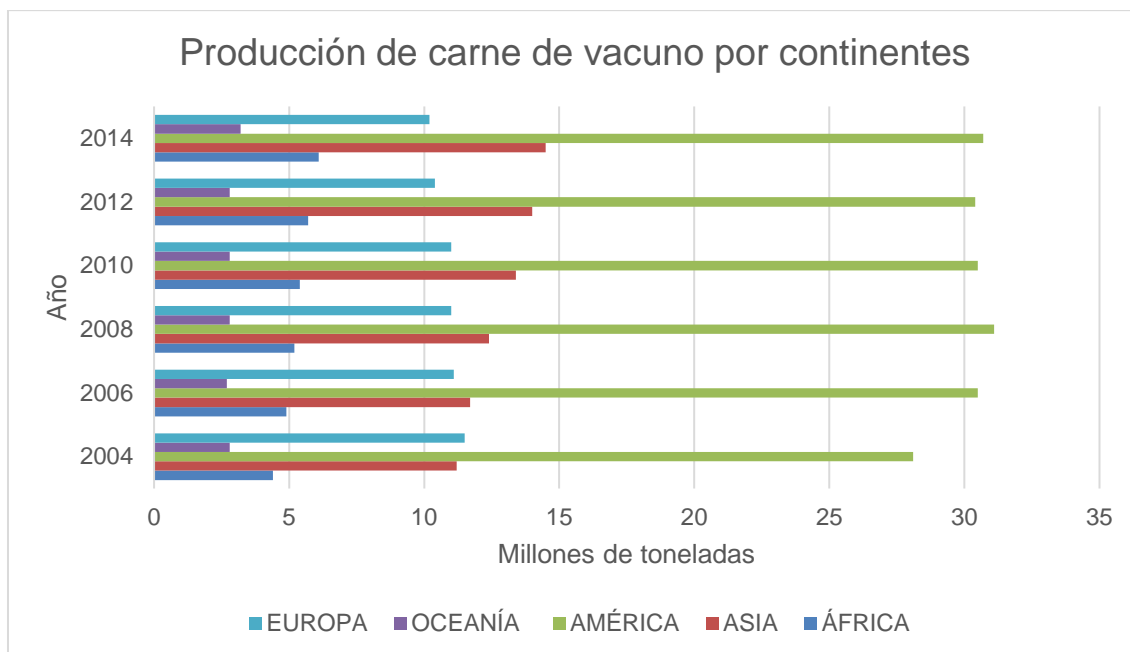


Figura 4. Producción de carne de vacuno por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).

El continente que en 2014 produjo más carne de **ovino** fue Asia (4,5 millones de toneladas), con un aumento del 7,1% en 2014 respecto a 2012. El continente que produjo menor cantidad fue América (0,4 millones de toneladas). La tendencia en la producción de carne de ovino se ha mantenido más o menos constante a lo largo de los años en Europa, Oceanía y América, mientras que en África se ha producido un incremento progresivo en la producción. Asia ha sido el continente con mayor producción, manteniéndose más o menos constantes sus niveles de producción desde 2006 hasta 2010 y aumentando en los últimos años (Figura 5).

Respecto a la carne de **pavo**, el continente que menos cantidad produjo fue Oceanía (0,02 millones de toneladas), y el que más produjo fue América (3,4 millones de toneladas), seguido de Europa (2 millones de toneladas). El continente que mostró un mayor incremento en la producción de este tipo de carne en 2014 respecto a 2012 fue Asia, que aumentó en este bienio su producción en 0,8 millones de toneladas (Figura 6).

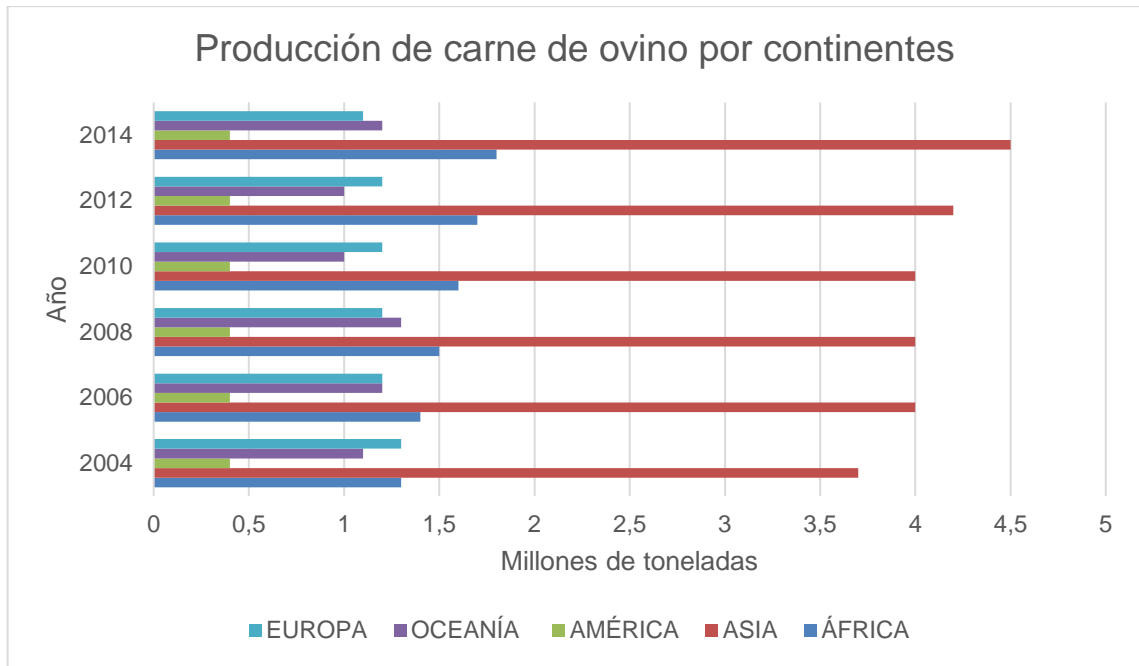


Figura 5. Producción de carne de ovino por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).

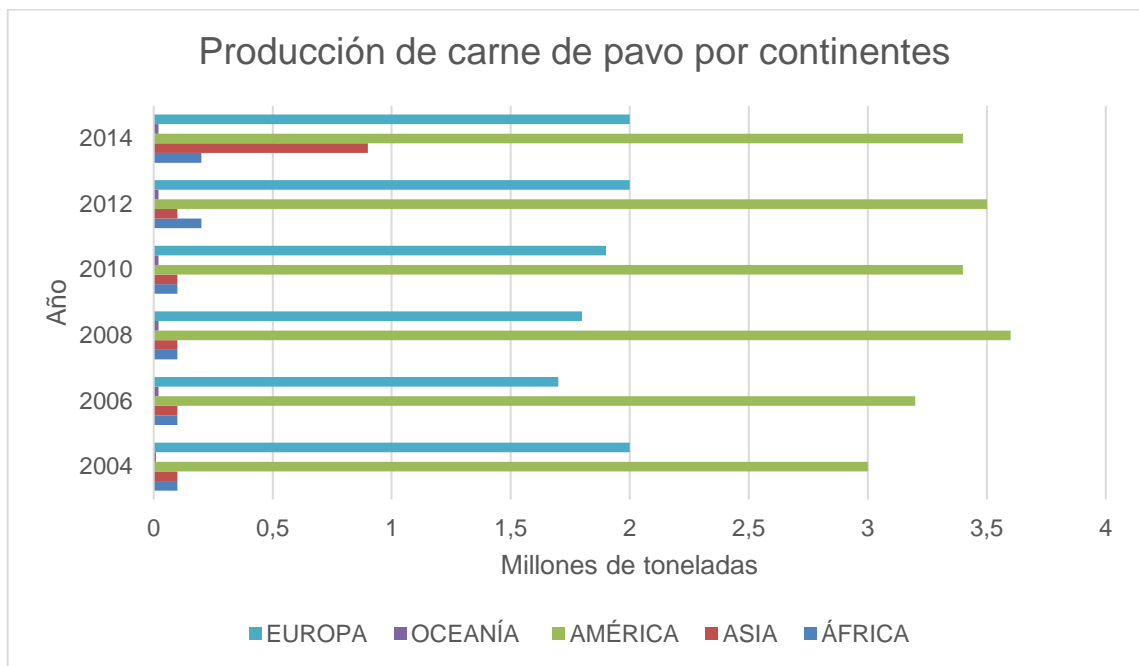


Figura 6. Producción de carne de pavo por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).

Finalmente, respecto a la carne de **caprino**, Asia es el continente que posee una mayor producción (4 millones de toneladas), seguido de África (1,3 millones de toneladas), siendo Oceanía el continente con menor producción de carne de caprino (0,03 millones de toneladas). La producción se ha mantenido constante a lo largo de los años en América, Oceanía y Europa, mientras que en Asia ha tenido lugar un aumento de producción de un 8,3% en 2014 respecto a la producción de 2012 (Figura 7).

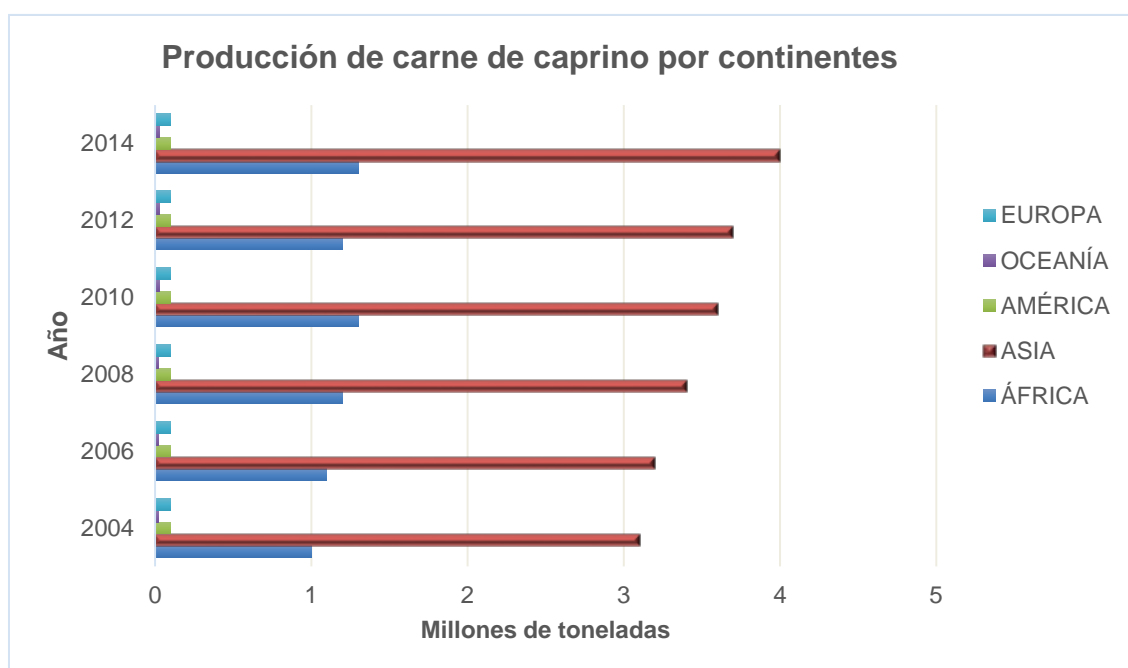


Figura 7. Producción de carne de caprino por continentes desde el año 2004 hasta el año 2014 (datos de FAOSTAT, 2017).

1.1.3. Tendencias en la producción de carne en la Unión Europea

Por lo que respecta concretamente a la Unión Europea, la carne más producida es la de porcino, seguida de la carne de pollo y de la de vacuno, en este orden. Por el contrario, la producción de caprino es la de menor importancia cuantitativa, ocupando el penúltimo puesto la producción de ovino. La tendencia en porcino y vacuno ha sido la de una disminución de la producción con el paso del tiempo, siendo más notable dicha disminución a partir del año 2010; en cambio se ha producido un aumento progresivo de la producción de carne de pollo, haciéndose esta situación notable a partir de 2008 (Figura 8).

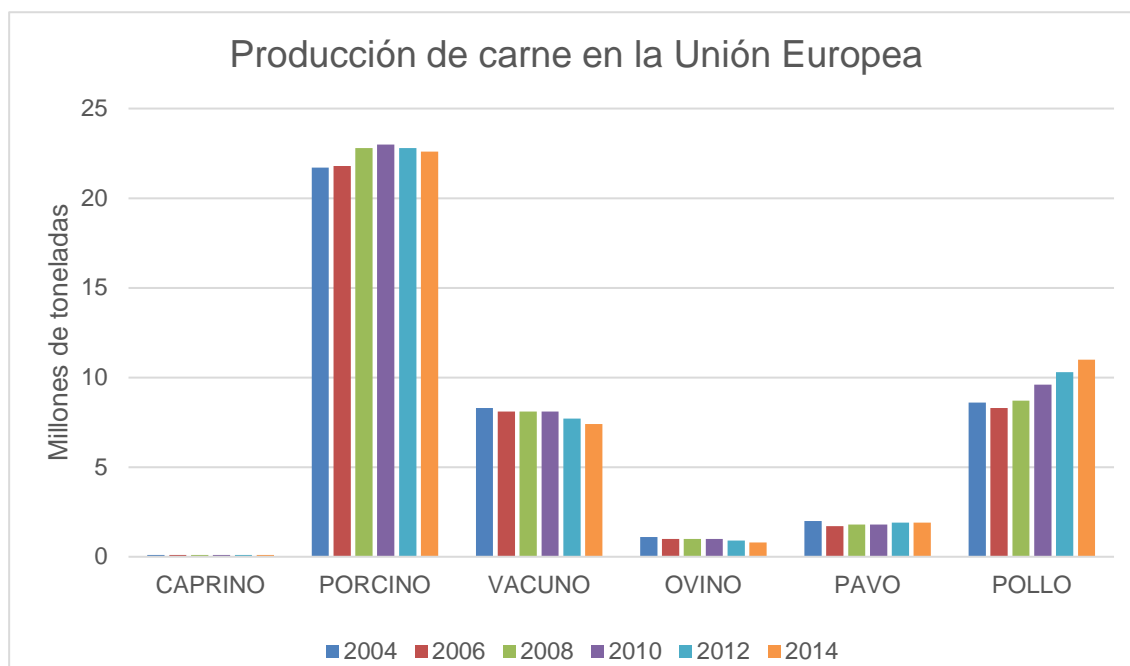
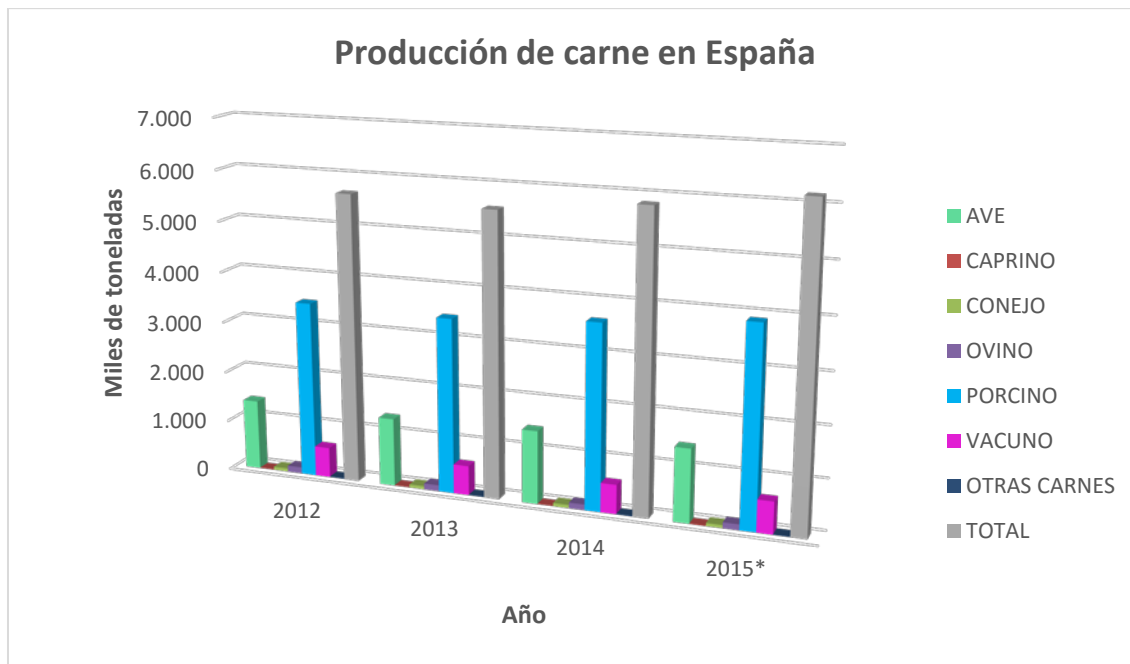


Figura 8. Tendencias en la producción de carne en la Unión Europea (datos de FAOSTAT, 2017).

1.1.4. Producción de carne en España en los últimos años

En 2015 se produjeron un total de 6174 miles de toneladas de carne, siendo la carne de ave el segundo tipo de carne más producido en el país (1443 miles de toneladas), por detrás de la carne de porcino (3896 miles de toneladas). La carne de conejo ha sido la única carne cuya producción ha tendido a disminuir en el último año, pasando de 64,3 miles de toneladas en 2014 a 62,7 miles de toneladas en 2015. Este tipo de carne es uno de los menos producidos, junto con la carne de caprino (9,2 miles de toneladas), la carne de ovino (116,5 miles de toneladas) y otras carnes (12,8 miles de toneladas).

A pesar de que en 2013 se produjo un descenso en el consumo de carne fresca en España, la producción de carne ha aumentado un 5,79% en el año 2015 respecto al año 2014. La producción de carne de porcino ha aumentado un 7,47% y la de carne de ave un 0,43% (Figura 9).



* Datos estimados

Figura 9. Producción de carne en España desde el año 2012 hasta el año 2015 (datos de MERCASA, 2017).

1.1.5. Comercio exterior de carne de España

En 2015 la carne de cerdo fue la más importada y exportada, seguida de la carne de ave. Como hecho destacable, señalar que se exportaron aproximadamente 1.800.000 toneladas de carne de cerdo, cantidad que supera con creces las 227.335 toneladas de carne de ave exportadas (Figura 10).

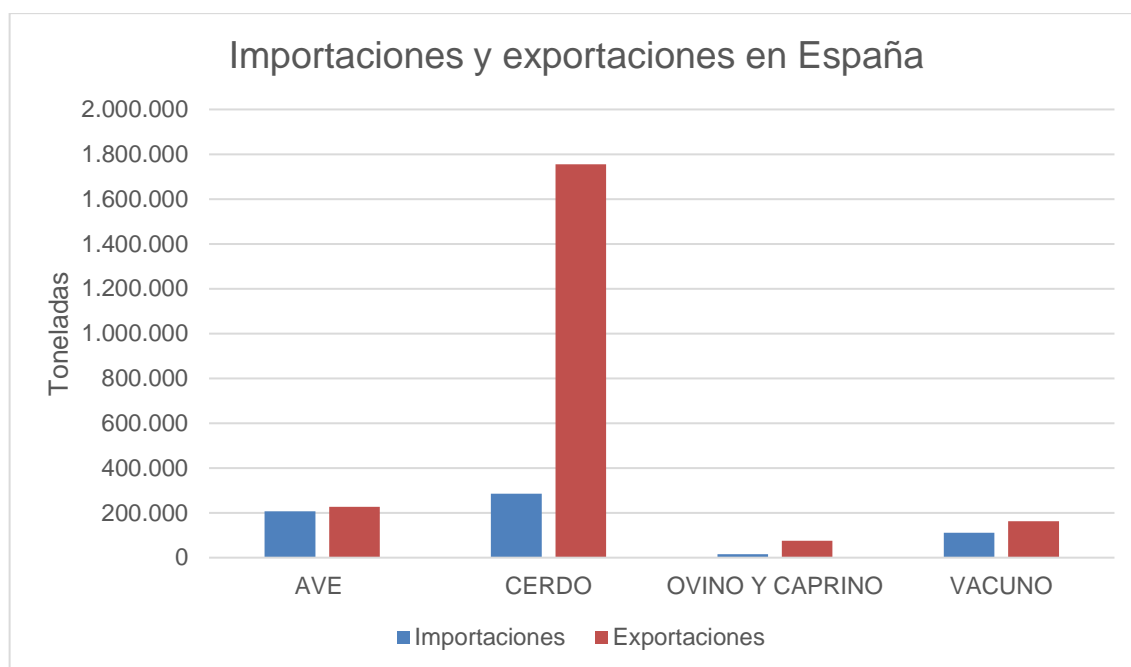


Figura 10. Comercio exterior en 2015 en España (datos de MAPAMA, 2016a, 2016b, 2017b, 2017c).

1.2. Consumo de carne en España

1.2.1. Comparativa de la estructura del gasto en carne en España entre 2014 y 2015 por Comunidades Autónomas

La Comunidad Autónoma que más recursos económicos invierte en la adquisición de carne es Aragón (386,1 € por persona y año), seguida de Cataluña (380,4 €), País Vasco (378,0 €) y Castilla y León (378,0 €). La Comunidad Autónoma que menos gasta en carne es Andalucía (266,7 €), situándose inmediatamente por encima Extremadura (277,9 €), Canarias (278,0 €) y la Región de Murcia (295,5 €). Aunque la región de Murcia se encuentra entre las Comunidades Autónomas que menos han gastado, ha sido una de las que más ha aumentado su gasto per cápita en 2015, junto con Canarias y Castilla-La Mancha, siendo La Rioja la que más ha disminuido su gasto per cápita para adquisición de carne (Figura 11).

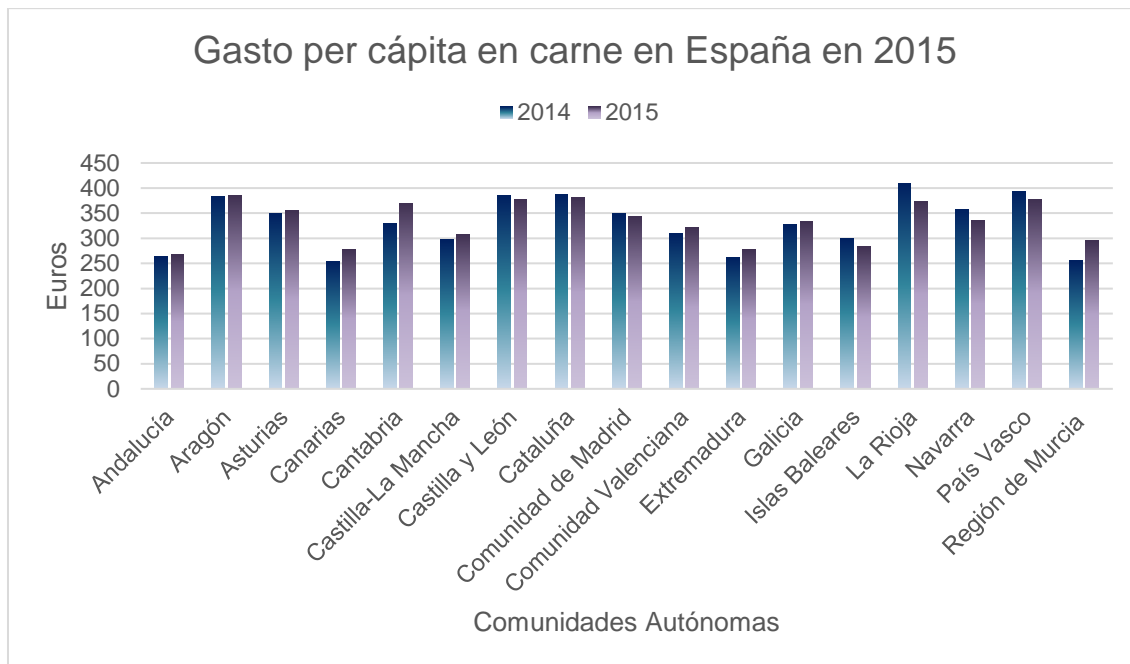


Figura 11. Comparativa del gasto per cápita en carne de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017).

La participación del gasto en carne sobre el gasto total se ha mantenido más o menos constante en todas las Comunidades Autónomas a excepción de La Rioja, que ha disminuido un 1,5% respecto al año anterior, y Canarias, donde ha aumentado un 0,9% respecto a 2014.

Castilla y León es la comunidad que gasta más en carne respecto al total (24,7%), seguida de Castilla-La Mancha (24,3%) y de Aragón (23,7%). Al contrario, las Islas Baleares, junto con Canarias, son las comunidades que participan menos en el gasto de carne, no llegando al 20% sobre el gasto total (Figura 12).

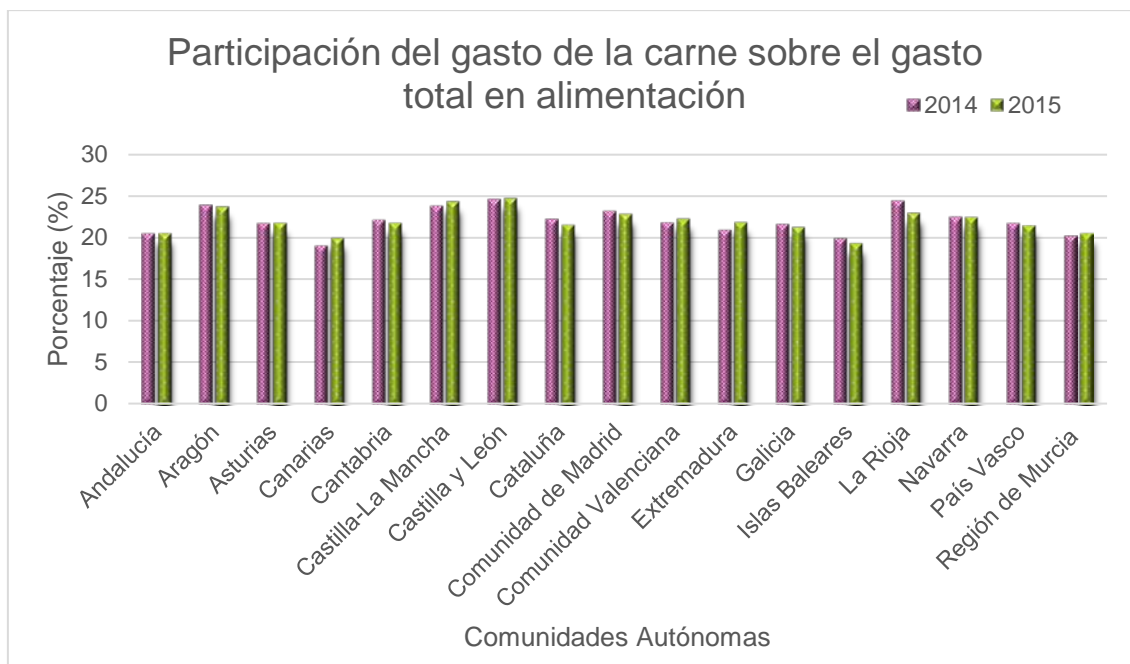


Figura 12. Comparativa de la participación del gasto de la carne sobre el gasto total en alimentación de España por Comunidades Autónomas de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017).

En la Figura 13 se ofrece una comparativa, expresada en porcentaje (%), entre la media del gasto en carne en España y el gasto medio en las distintas Comunidades Autónomas. La Comunidad Autónoma con el menor gasto, respecto a la media nacional, es Andalucía (-18,7%), seguida de Canarias (-15,2%). Por el contrario, Aragón (17,7%), junto con Castilla y León (15,2%) y el País Vasco (15,2%), son las Comunidades Autónomas con mayor gasto en carne, respecto a la media nacional.

En relación con la desviación respecto de la media nacional en el gasto de carne existen diferencias notables entre 2014 y 2015, si bien se han mantenido las tendencias de desviación positiva o negativa. La Rioja ha sido la comunidad en la que más ha disminuido el consumo de carne en 2015 (12%), mientras que la Región de Murcia (11,6%) ha sido en la que más ha aumentado el consumo de carne en el mismo año, aunque su porcentaje se encuentre por debajo del de la media nacional.

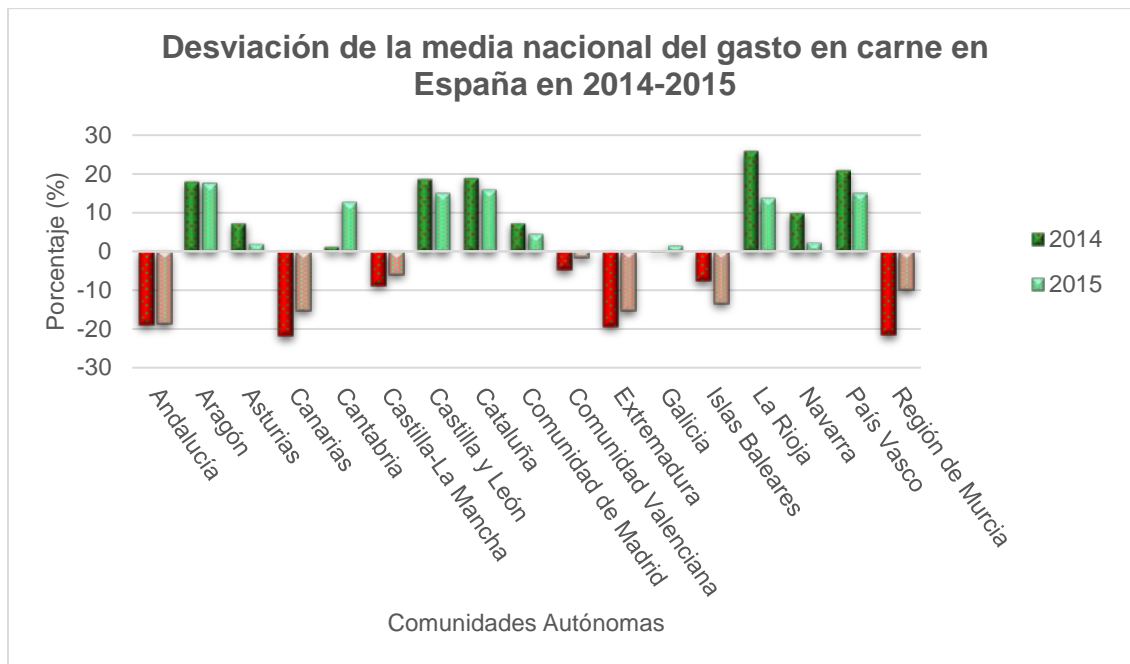


Figura 13. Comparativa de la media nacional del gasto en carne en España por Comunidades Autónomas de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017).

1.2.2. *Variación del consumo de carne en los hogares españoles*

Como se observa en las Figuras 14 y 15, existe un descenso generalizado del consumo de carne, siendo el grupo “resto de carne congelada” el tipo de carne en el que más ha descendido el consumo, seguido del grupo de los pequeños rumiantes. Respecto a las Comunidades Autónomas, La Rioja es la comunidad en la que más ha descendido el consumo de carne y la Región de Murcia aquella en la que más ha aumentado dicho consumo.

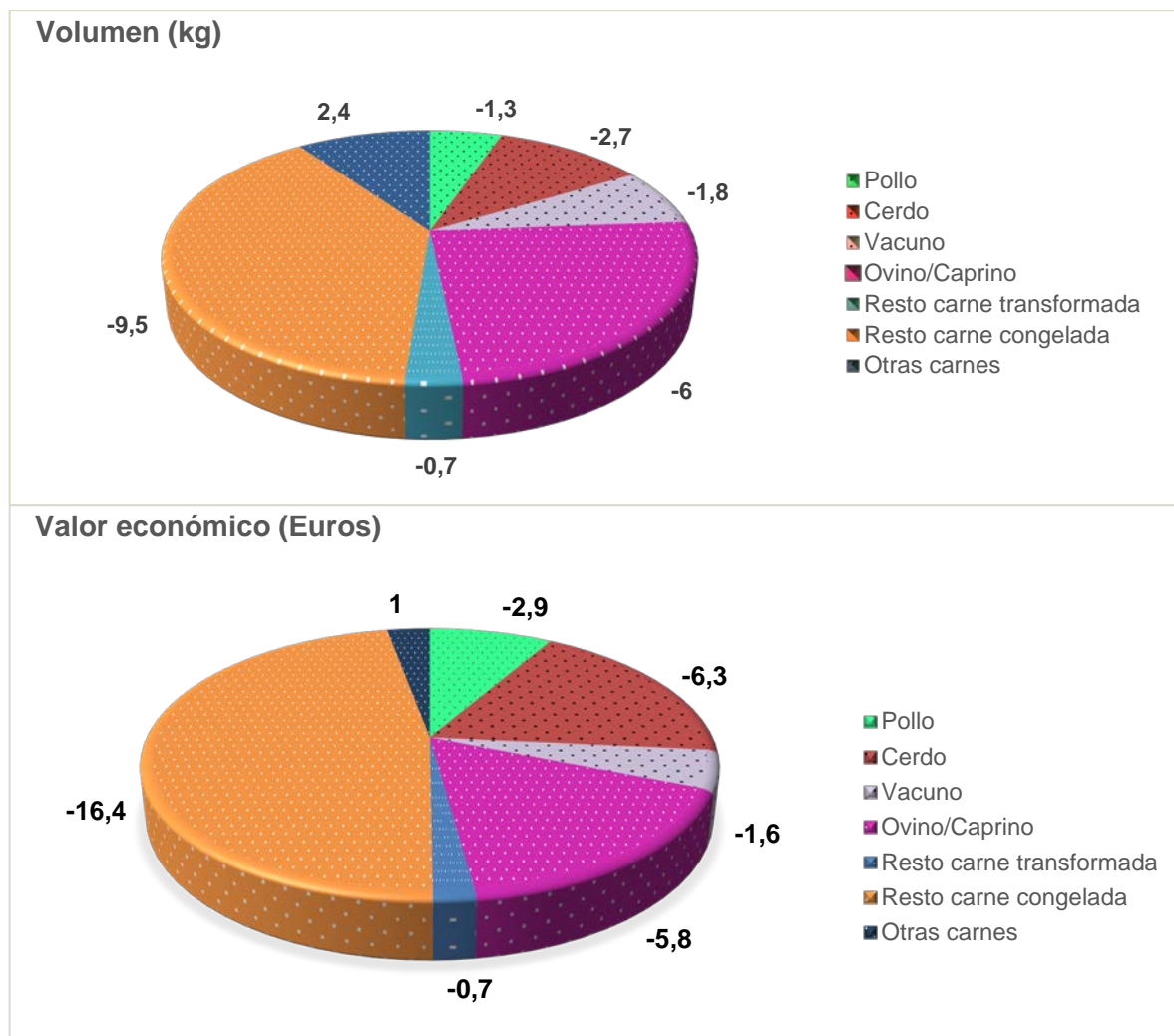


Figura 14. Comparativa de la variación (%) del consumo de carne de febrero de 2017 respecto a febrero de 2016 en los hogares (datos de MAPAMA, 2017d).

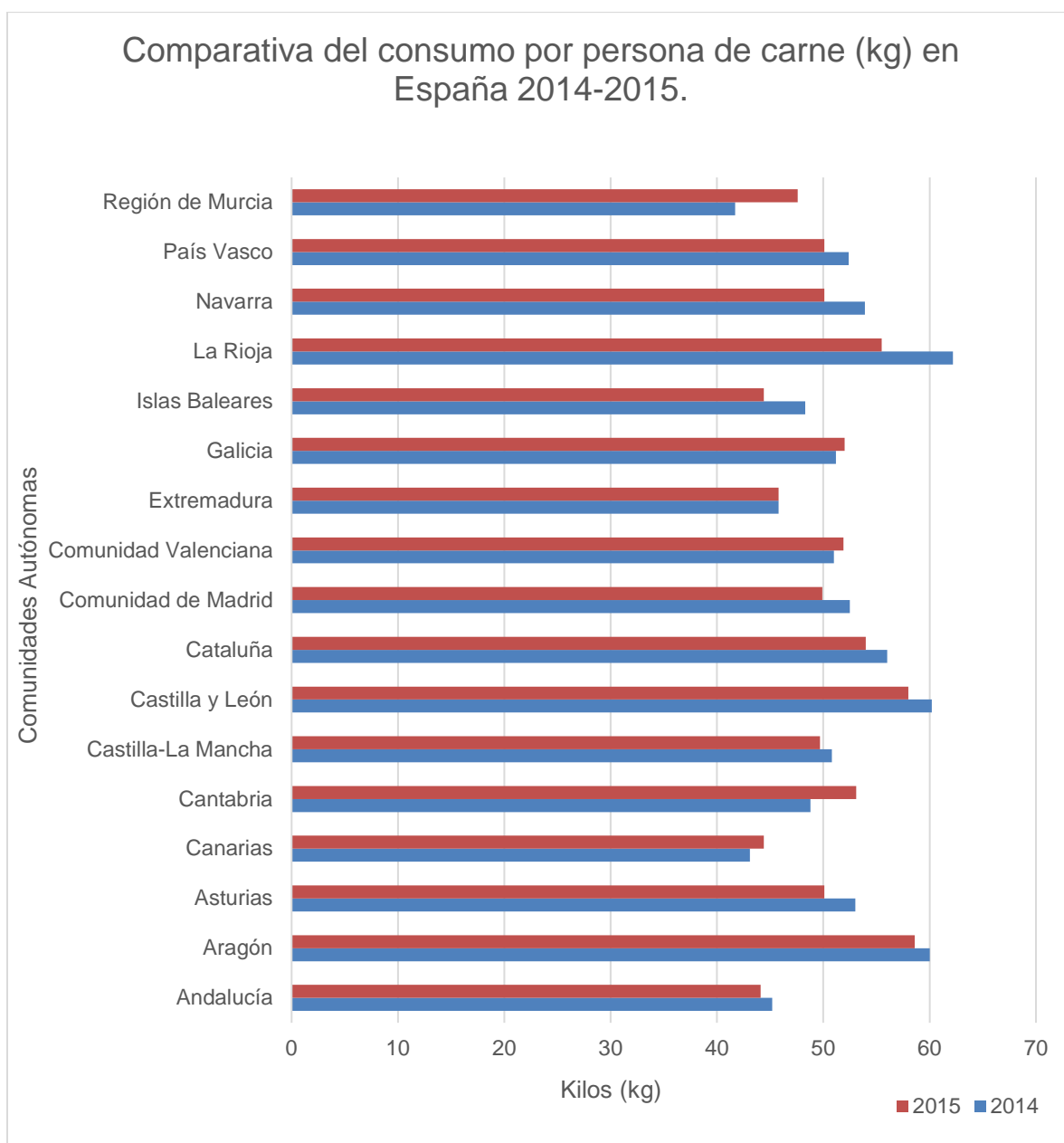


Figura 15. Comparativa del consumo per cápita de carne en España por Comunidades Autónomas de 2014 y 2015 (datos de MERCASA, 2017).

1.3. Ventajas e inconvenientes del consumo de carne de ave

El *Codex Alimentarius* define la “carne” como *todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin*. La carne se compone de agua, proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como por pequeñas cantidades de hidratos de carbono (FAO, 2015).

La mayoría de los expertos consideran que el pollo doméstico (*Gallus domesticus*) tiene su origen en la estirpe asiática Red Jungle. Los pollos actuales son de mayor tamaño y más productivos que el ave ancestral Red Jungle. Hay cuatro tipos básicos: 1) ponedoras, 2) silvestres, 3) de engorde y 4) Bantam (ornamentales). Dentro de estos tipos, hay aproximadamente 1233 diferentes razas de pollos reconocidas. La mayor parte de los pollos de asar son pollos híbridos (FAO, 2014a).

1.3.1. Peligros microbiológicos derivados del consumo de carne de ave

La inocuidad de la carne de ave y de los productos avícolas depende de la carga microbiana de los mismos, que afecta también a su vida útil. El Reglamento de la Comisión Europea (CE) N° 2073/2005 describe los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, incluida la carne de ave y los productos derivados. Esta normativa especifica los recuentos máximos de microorganismos en carne y productos avícolas.

Los microorganismos encontrados en la superficie de las canales de los animales son principalmente bacterias Gram-negativas tales como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Enterobacter* y *Escherichia*. En cuanto a bacterias Gram-positivas se encuentran *Brochothrix*, bacterias ácido lácticas y también pueden estar presentes especies de la familia *Micrococcaceae*. Las especies microbianas y los niveles de microorganismos en la carne están influenciados por la especie animal, su salud, el tipo de manipulación de los animales vivos (grado de bienestar animal), las prácticas de sacrificio, el tiempo de almacenamiento y la temperatura de almacenamiento, entre otros factores. La determinación en la carne de ave de los grupos microbianos mencionados puede indicarnos su calidad microbiológica, el grado de higiene de los procesos de obtención y posterior manipulación de la misma o el correcto mantenimiento de la cadena de frío, así como ayudarnos a predecir la vida útil del producto (O'Sullivan, 2016).

La ingestión de carne de pollo puede provocar infecciones e intoxicaciones alimentarias como consecuencia, fundamentalmente, de eventos de contaminación cruzada o de un insuficiente cocinado (Ravishankar *et al.*, 2010). Además, en algunos procesos, como la intoxicación por *Staphylococcus aureus*, se pueden producir casos de enfermedad humana aún cuando el tratamiento térmico ha sido el correcto, dada la elevada termorresistencia de las toxinas estafilocócicas (Del Río *et al.*, 2006; Cohen *et*

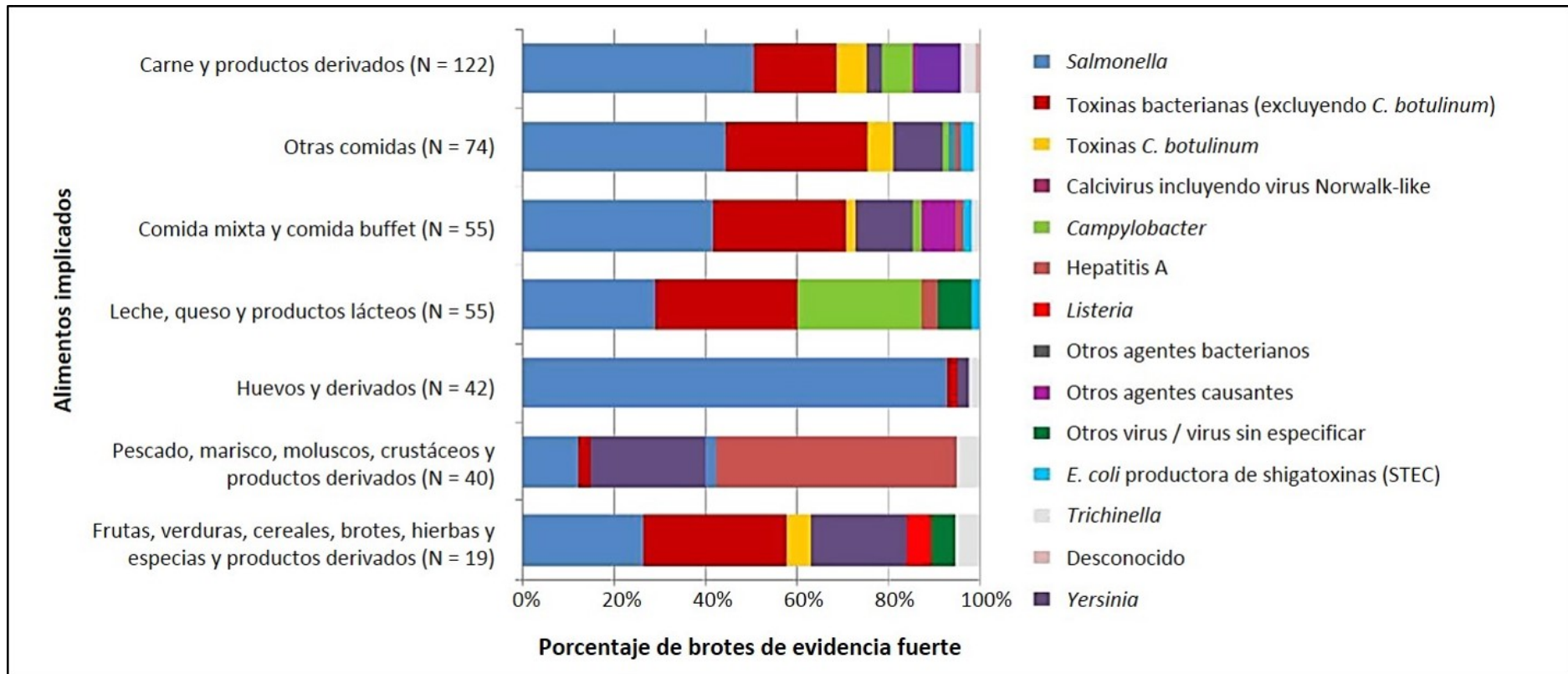
al., 2007). En la Figura 16 se muestra la importancia relativa de la carne de ave en los brotes de enfermedad humana transmitida por alimentos en la Unión Europea.

En 2015, 26 Estados Miembros informaron de un total de 4362 brotes de enfermedad transmitida por alimentos, un 17% menos que en 2014. Estos brotes, incluidos los transmitidos por el agua, causaron 45.874 casos de enfermedad (209 más que en 2014), 3892 hospitalizaciones (2546 menos que en 2014) y 17 muertes (10 menos que en 2014).

Con respecto a la carne de pollo como vehículo de enfermedad humana, en 2015 se informó de 37 brotes, que se corresponden con un 8,8% del total de brotes transmitidos por alimentos (incluyendo el agua), estando asociados a 596 casos, que suponen un 6,1% del total, siendo la tasa de enfermedad de 0,008 por 100.000 habitantes, disminuyendo un 0,001 respecto a los datos de años previos (2010-2014).

Existen programas nacionales de control con el fin de disminuir la prevalencia de *Salmonella* en carne de ave. En 2015, la mayoría de los Estados Miembros cumplieron sus objetivos de reducción de *Salmonella* en carne de ave, a pesar de que, en determinados productos cárnicos, como la carne picada y los preparados de carne de ave, se halló un nivel notable de incumplimiento (6,8% de muestras individuales y 5,1% de los lotes), con valores similares a los del año anterior. *Salmonella* se detectó con mayor frecuencia en carne de pollo (6,5%) y en carne de pavo (4,6%).

En la Figura 16 se puede observar la distribución de los agentes causantes en función del alimento implicado como vehículo de transmisión de brotes de origen alimentario. La distribución fue similar para «carne y productos derivados», «comida mixta y comida tipo buffet», «leche, queso y productos lácteos», y «otras comidas», situándose *Salmonella* a la cabeza por lo que respecta al número de brotes en que se vio involucrado el microorganismo; en concreto en el epígrafe de «carne y productos derivados» este microorganismo fue el agente etiológico de la mitad de los brotes. En segundo lugar, se encuentran las toxinas bacterianas, seguidas de virus y otros agentes causales, en menor proporción (EFSA, 2016).



No se muestra en la figura un único brote producido por toxinas bacterianas distintas de *C. botulinum* en bebidas y agua, y seis brotes con vehículo alimenticio desconocido. **Otros agentes bacterianos** incluyen *Francisella*, *Shigella*, *E. coli* patógena no productora de toxinas shiga. **Toxinas bacterianas** incluyen las toxinas producidas por *Bacillus*, *Clostridium* que no sea *C. botulinum*, toxinas estafilocócicas y otras toxinas bacterianas no especificadas. **Otros virus** incluyen adenovirus, flavivirus, rotavirus y otros virus no especificados. **Otros agentes causantes** incluyen agentes químicos, histamina, biotoxinas marinas, toxinas de hongos y escombrotóxina.

Figura 16. Frecuencia de distribución de los agentes causantes de brotes de fuerte evidencia epidemiológica asociados con los vehículos alimentarios (incluyendo el agua) implicados en la Unión Europea, 2015 (adaptado de EFSA, 2016).

En la Figura 17 se observan las etapas en la producción de carne de ave desde que los animales llegan al matadero hasta su preparación para la venta, así como el riesgo de contaminación microbiana en cada etapa.

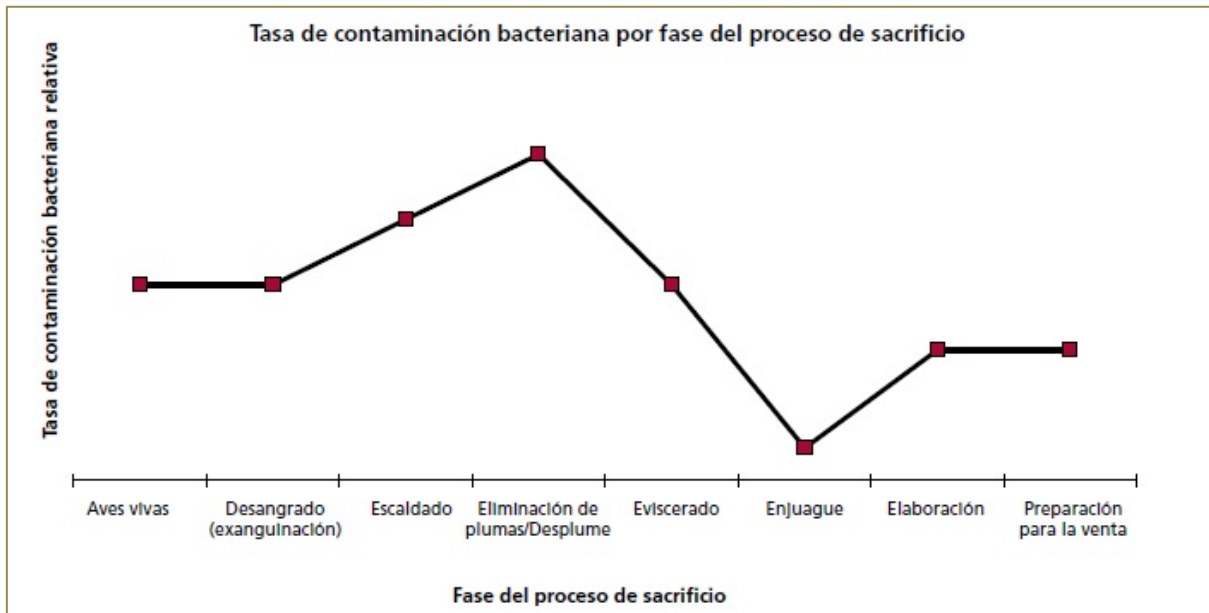


Figura 17. Tasa de contaminación bacteriana por fase de proceso de sacrificio (FAO, 2013).

Existen etapas durante el procesado de las aves que diseminan la contaminación microbiana con la que llegan los animales al matadero, como son, principalmente, las etapas de escaldado, desplumado y evisceración. Durante las distintas fases se suma también la contaminación derivada del personal, las superficies, el agua utilizada y las instalaciones. Por estas razones, cuando las aves se preparan para la venta (etapa final), contienen contaminación indeseable, variable y en ocasiones elevada (Del Río *et al.*, 2006; Corry, 2009).

1.3.2. Ventajas del consumo de carne de ave respecto al consumo de otras carnes

Como se ha indicado, la carne de ave es la segunda carne más consumida en el ámbito mundial, hecho que se debe a una serie de beneficios frente al consumo de otras carnes (Figura 18).



Figura 18. Beneficios del consumo de carne de pollo.

En efecto, la carne de ave presenta una serie de características que la hacen más beneficiosa que otras carnes. Posee un bajo contenido en grasa, encontrándose la mayor parte de la misma debajo de la piel, siendo, por lo tanto, fácil de eliminar. Además, aproximadamente la mitad de las grasas son beneficiosas (monoinsaturadas), mientras que únicamente un tercio son indeseables (saturadas). Esto hace que este tipo de carne sea más saludable que la carne roja, que además de poseer más grasas saturadas, tiene mayores niveles de ácidos grasos *trans*, relacionados con hipercolesterolemia. Además, la carne de ave es admitida por todas las culturas y religiones (por ejemplo, musulmanes e hindúes), cosa que no ocurre con otros tipos de carne, lo cual hace que presente un elevado consumo en las distintas zonas geográficas (FAO, 2013).

1.3.3. Definiciones de carne y productos cárnicos

A continuación, y de acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establece la normativa específica de higiene de los alimentos de origen animal, y el Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos, se establecen las definiciones de interés relacionadas con la carne y productos cárnicos avícolas:

- **Aves de corral:** las aves de cría, incluidas las aves que no se consideran domésticas pero que se crían como animales domésticos, con excepción de las ratites (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Caza silvestre:** los ungulados y lagomorfos silvestres, así como otros mamíferos terrestres que se cazan para el consumo humano y son considerados caza silvestre con arreglo a la legislación aplicable en el Estado Miembro de que se trate, incluidos los mamíferos que viven en territorios cerrados en condiciones de libertad similares a las de los animales de caza silvestre, y las aves silvestres cazadas para el consumo humano (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Canal:** el cuerpo de un animal una vez sacrificado y faenado (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Carne fresca:** la carne que no ha sido sometida a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la carne envasada al vacío o envasada en atmósfera controlada (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Despojos:** la carne fresca que no sea la de la canal, incluidas las vísceras y la sangre (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Vísceras:** los órganos de las cavidades torácica, abdominal y pélvica, así como la tráquea y el esófago y, en el caso de las aves, el buche (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Carne picada:** la carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos del 1% de sal (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Carne separada mecánicamente (CSM):** el producto obtenido extrayendo la carne de los huesos carnosos después del deshuesado, o de las canales de las

aves, por medios mecánicos que ocasionan la pérdida o alteración de la estructura de la fibra muscular (Reglamento -CE- N° 853/2004).

- **Preparados de carne:** la carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Derivados cárnicos:** son los productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o menudencias de los animales citados en el punto 1.1 del anexo I del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, y sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo. Serán preparados o productos cárnicos según lo establecido en la normativa comunitaria de aplicación (RD 474/2014).
- **Productos cárnicos:** los productos transformados resultantes de la transformación de la carne o de la nueva transformación de dichos productos transformados, de modo que la superficie de corte muestre que el producto ha dejado de poseer las características de la carne fresca (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Menudencias:** son las partes comestibles, no incluidas en la canal, de los animales citados en el punto 1.1 del anexo I del Reglamento 853/2004 (RD 474/2014).
- **Grasas animales fundidas:** las grasas obtenidas por fundición mediante tratamiento térmico de la carne (incluidos los huesos) y destinadas al consumo humano (Reglamento -CE- N° 853/2004).
- **Pastas, cremas, espumas y mousses:** son productos elaborados a partir de los contemplados en la presente norma a los que se les han añadido otros ingredientes, condimentos y aditivos, y se han sometido a unas condiciones de picado para conferirles una textura típica y que, en función de su grado de consistencia, de mayor a menor densidad, se denominan pastas, cremas, espumas o mousses (RD 474/2014).

1.3.4. Normativa aplicable a la carne y productos cárnicos.

a) Normativa de carácter europeo de aplicación directa.

- Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. [DOUE núm. 31, de 1 de febrero de 2002, páginas 1 a 24 (24 págs.). DOUE-L-2002-80201]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32002R0178>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Reglamento (CE) N° 543/2008 de la Comisión de 16 de junio de 2008 por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (CE) N° 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a la comercialización de carne de aves de corral. [DOUE núm. 350, de 20 de diciembre de 2012, páginas 63 a 66 (4 págs.). DOUE-L-2012-82593]. Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:157:0046:0087:ES:PDF>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. [DOUE núm. 304, de 22 de noviembre de 2011, páginas 18 a 63 (46 págs.). DOUE-L-2011-82311] Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:es:PDF>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establece la normativa específica de higiene de los alimentos de origen animal. [DOUE núm. 139, de 30 de abril de 2004, páginas 55 a 205 (151 págs.). DOUE-L-2004-81036]. Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:ES:PDF>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Reglamento (UE) N° 1086/2011 de la Comisión de 27 de octubre de 2011 por el que se modifican el anexo II del Reglamento (CE) N° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo I del Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión en lo que concierne a salmonela en la carne fresca de aves de corral. [DOUE núm. 281, de 28 de octubre de 2011, páginas 7 a 11 (5 págs.). DOUE-L-2011-82158]. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2011/281/L00007-00011.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.

- Reglamento (CE) N° 1234/2007 del Consejo de 22 de octubre de 2007 por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM). [DOUE núm. 299, de 16 de noviembre de 2007, páginas 1 a 149 (149 págs.). DOUE-L-2007-82055]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2007R1234:20090701:ES:PDF>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. [DOUE núm. 338, de 22 de diciembre de 2005, páginas 1 a 26 (26 págs.). DOUE-L-2005-82539]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=ES>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Reglamento (CE) N° 2074/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) N° 853/2004 y (CE) N° 854/2004. [DOUE núm. 338, de 22 de diciembre de 2005, páginas 27 a 59 (33 págs.). DOUE-L-2005-82540]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0027:0059:ES:PDF>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. [DOUE núm. 322, de 7 de diciembre de 2007, páginas 12 a 29 (18 págs.). DOUE-L-2007-82244]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:ES:PDF>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.

b) Normativa estatal, aplicable únicamente en ausencia de Reglamentos generales prevalecientes.

- Orden de 14 de enero de 1986 por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas al mercado interior. [BOE núm. 18, de 21 de enero de 1986, páginas 2935 a 2937 (3 págs.). BOE-A-1986-1598]. Disponible en:

<https://www.boe.es/boe/dias/1986/01/21/pdfs/A02935-02937.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.

- Real Decreto 2551/1994, de 29 de diciembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal y sanitarias aplicables a los intercambios e importaciones de productos no sometidos, con respecto a estas condiciones, a las normas específicas establecidas en el capítulo I del Anexo A del Real Decreto 49/1993, de 15 de enero, y, por lo que se refiere a los patógenos, en el Real Decreto 1316/1992, de 30 de octubre. [BOE núm. 35, de 10 de febrero de 1995, páginas 4526 a 4538 (13 págs.). BOE-A-1995-3553]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/1995/02/10/pdfs/A04526-04538.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor. [BOE núm. 273, de 14 de noviembre de 2003, páginas 40094 a 40101 (8 págs.). BOE-A-2003-20838]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2003/11/14/pdfs/A40094-40101.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Real Decreto 1976/2004, de 1 de octubre, por el que se establecen las normas zoonosológicas aplicables a la producción, transformación, distribución e introducción de los productos de origen animal destinados al consumo humano. [BOE núm. 249, de 15 de octubre de 2004, páginas 34461 a 34466 (6 págs.). BOE-A-2004-17702]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2004/10/15/pdfs/A34461-34466.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Real Decreto 639/2006, de 26 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 2551/1994, de 29 de diciembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal y sanitarias aplicables a los intercambios e importaciones de productos no sometidos a las normas específicas establecidas en el Real Decreto 49/1993, de 15 de enero, y en el Real Decreto 1316/1992, de 30 de octubre. [BOE núm. 126, de 27 de mayo de 2006, páginas 19998 a 19999 (2 págs.). BOE-A-2006-9299]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19998-19999.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. [BOE núm. 126, de 27 de mayo de 2006, páginas 19999 a 20002 (4 págs.). BOE-A-2006-9300]. Disponible en:

<https://www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19999-20002.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.

- Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios. [BOE núm. 49, de 25 de febrero de 2010, páginas 18297 a 18299 (3 págs.). BOE-A-2010-3032]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2010/02/25/pdfs/BOE-A-2010-3032.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Real Decreto 728/2011, de 20 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor. [BOE núm. 131, de 2 de junio de 2011, páginas 54461 a 54462 (2 págs.). BOE-A-2011-9620]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2011/06/02/pdfs/BOE-A-2011-9620.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Real Decreto 1338/2011, de 3 de octubre, por el que se establecen distintas medidas singulares de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene de la producción y comercialización de los productos alimenticios. [BOE núm. 248, de 14 de octubre de 2011, páginas 107631 a 107635 (5 págs.). BOE-A-2011-16118]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2011/10/14/pdfs/BOE-A-2011-16118.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Orden PRE/2169/2013, de 18 de noviembre, por la que se modifican el anexo I del Real Decreto 1977/1999, de 23 de diciembre, por el que se establecen los principios relativos a la organización de los controles veterinarios sobre los productos procedentes de países terceros, y el anexo II del Real Decreto 1976/2004, de 1 de octubre, por el que se establecen las normas zoonitarias aplicables a la producción, transformación, distribución e introducción de los productos de origen animal destinados al consumo humano. [BOE núm. 280, de 22 de noviembre de 2013, páginas 93094 a 93096 (3 págs.). BOE-A-2013-12266]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2013/11/22/pdfs/BOE-A-2013-12266.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. [BOE núm. 147, de 18 de junio de 2014, páginas 46058 a 46078 (21 págs.). BOE-A-2014-6435]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2014/06/18/pdfs/BOE-A-2014-6435.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.

2. ANTIMICROBIANOS USADOS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS

La resistencia a los antibióticos, que ha aumentado de manera drástica en las últimas décadas, supone una dificultad importante en el tratamiento de las infecciones (Fraqueza, 2015). El principal factor de riesgo en la emergencia de la resistencia, tanto en medicina humana como en veterinaria, es la presión selectiva provocada por el consumo de antibióticos (Daikos *et al.*, 2008). Sin embargo, actualmente existe una preocupación creciente en relación con la transmisión de bacterias resistentes a lo largo de la cadena de producción de alimentos y en los últimos años está adquiriendo un gran protagonismo la contribución de la Industria Alimentaria a este problema (Capita & Alonso-Calleja, 2013). En efecto, la cadena alimentaria ha sido reconocida como una de las rutas principales de transmisión de bacterias resistentes a antimicrobianos desde los animales hasta el hombre. Como se indicará a lo largo de esta Introducción, existen evidencias que establecen un vínculo entre el uso de antimicrobianos en la cadena de producción de alimentos y la aparición de resistencia en los microorganismos patógenos comunes.

Con el fin de garantizar la calidad y seguridad de los productos, a la vez que para mejorar la eficiencia del Sistema Alimentario, se utilizan diferentes compuestos antimicrobianos durante la producción de los alimentos. En la Tabla 1 se muestran los principales compuestos antimicrobianos usados en la Industria Agroalimentaria.

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

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

2.1. Antibióticos

Por lo que respecta a los antibióticos, existen problemas higiénico-sanitarios debidos al uso de antibióticos en animales productores de alimentos, que vienen determinados por dos tipos de efectos. Los efectos directos se derivan del empleo de antibióticos a dosis terapéuticas y su persistencia posterior en los alimentos, siempre que no se respeten los tiempos de espera, y las consecuencias legales que ello conlleva. Los efectos indirectos están en relación con la influencia negativa en el análisis bacteriológico de los alimentos, las propiedades alergizantes, la capacidad de inducir resistencia a los antibióticos y los problemas tecnológicos de producción de alimentos fermentados ya que, a dosis suficientes, los antibióticos pueden interferir en cualquier proceso de crecimiento microbiano (Hernández-Rodríguez & Sastre-Gallego, 1999).

Las infecciones causadas por microorganismos resistentes son problemáticas desde el punto de vista clínico, ya que responden con dificultad a los tratamientos farmacológicos, son más difíciles de tratar e implican unos costes sanitarios más elevados. Esto conlleva importantes repercusiones en términos de morbilidad y mortalidad (Rice, 2009; Capita & Alonso-Calleja, 2013). Según el reciente informe de Organización Mundial de la Salud (WHO, 2014), la resistencia a los antibióticos es una amenaza creciente para la Salud Pública, ya que muchas de las opciones de tratamiento disponibles para las infecciones comunes pueden convertirse en ineficaces. La introducción de cada agente antimicrobiano en la práctica clínica ha estado seguida por la detección en el laboratorio de cepas de microorganismos resistentes, capaces de multiplicarse en presencia de antibióticos a concentraciones superiores a las dosis terapéuticas usadas en medicina (EPHA, 2012; ECDC, 2016).

El origen genético de la resistencia a los antibióticos es un tema controvertido; por lo general la resistencia a los antibióticos en las bacterias de la cadena alimentaria se atribuye al contacto con el agente antimicrobiano (Levy & Marshall, 2004). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los genes de resistencia a antibióticos existen ya desde antes del uso humano de estos compuestos (D'Costa *et al.*, 2011; Bhullar *et al.*, 2012). Más que el propio uso de antibióticos, el principal problema en relación con el incremento de la prevalencia de resistencia a los antibióticos es el empleo de los mismos en condiciones inadecuadas, siguiendo pautas de administración incorrectas.

En efecto, el empleo a gran escala de antibióticos, en medicina humana y en producción primaria de alimentos, ha sido reconocido como una de las principales

causas del incremento de la prevalencia de bacterias resistentes en poblaciones humanas, que se transmiten principalmente a través de alimentos de origen animal contaminados (Capita González, 2013). En los últimos años, el uso de antibióticos en medicina ha crecido sustancialmente (aumento del 36% entre 2000 y 2010), principalmente en países en vías de desarrollo, donde se han observado los mayores incrementos absolutos en el uso de cefalosporinas, penicilinas de amplio espectro y fluoroquinolonas (Van Boeckel *et al.*, 2014).

Por lo que respecta a veterinaria, el último informe del *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (ESVAC, 2016), en relación con las ventas globales en el año 2014 para 29 países, afirma que las mayores proporciones, expresadas en mg/UCP (unidad de corrección de población), se obtuvieron en tetraciclinas (33,4%), penicilinas (25,5%) y sulfonamidas (11%). El uso frecuente de antibióticos para tratar, controlar o prevenir enfermedades aumenta la probabilidad de aparición de nuevas cepas resistentes a antibióticos, que se pueden transmitir a lo largo de la cadena alimentaria (Teale, 2002). En este sentido, existen evidencias de que las poblaciones bacterianas aisladas del intestino de animales expuestos a antibióticos tienen cinco veces más probabilidades de ser resistentes a cualquier antibiótico que otras poblaciones microbianas no expuestas (Sarmah *et al.*, 2006).

Las actividades humanas diversas (p. ej. explotaciones ganaderas o núcleos urbanos) han tenido un papel predominante en el desarrollo e incremento de la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en reservorios ambientales. De hecho, el aumento de la contaminación con antibióticos promovida por la actividad humana tiene un papel clave en la selección de cepas mutantes resistentes a antibióticos y favorece la adquisición de genes determinantes de resistencia en la microbiota ambiental (Martínez, 2009; Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). El abuso de antibióticos puede enriquecer la población con microorganismos resistentes y reducir el porcentaje de los susceptibles.

Las bacterias que contienen genes de resistencia en elementos genéticos móviles son una amenaza para la Salud Pública, ya que pueden actuar como reservorios, favoreciendo la propagación de la resistencia a otros microorganismos por transferencia horizontal, como se comentará con detalle posteriormente (Haug *et al.*, 2011; Talon & Leroy, 2011; Marty *et al.*, 2012). En consecuencia, los alimentos colonizados por bacterias que albergan dichos genes transferibles de resistencia a antibióticos son una preocupación importante y creciente.

2.1.1. Uso de antibióticos en animales productores de alimentos

El uso de antimicrobianos en nutrición animal, como promotores del crecimiento, comenzó hace aproximadamente 50 años. Las primeras experiencias (en pollos) que demostraron los efectos beneficiosos de los antibióticos a dosis subterapéuticas datan de finales de los años 40, y en la década de los 60 su empleo comercial estaba ampliamente extendido en Europa. En aquellos tiempos se usaban sustancias que a mayores dosis tenían actividades terapéuticas (penicilinas, estreptomicina o tetraciclinas) (Cepero Briz, 2006). Tanto en los países de Norteamérica como en Europa, se estima que el 50%, en peso, de los antibióticos consumidos se destinaban a los animales productores de alimentos para la promoción del crecimiento (WHO, 2002). No obstante, muy pronto surgieron, desde el mundo científico, críticas a esta práctica, alegando posibles riesgos para la salud humana, siendo el principal motivo de preocupación la posibilidad de que en el intestino de los animales se produzca una selección de bacterias con resistencia a estos antibióticos, y que dichas bacterias se transmitan al ser humano a través de los alimentos, provocando infecciones difíciles de tratar (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

El *Codex Alimentarius* define “contaminante” como *cualquier sustancia no adicionada intencionadamente al alimento, que está presente en el mismo como resultado de la producción (incluyendo operaciones llevadas a cabo en agricultura, ganadería o medicina veterinaria), elaboración, procesado, preparación, tratamiento, embalaje, enlatado, transporte o comercio de tal alimento o como resultado de contaminación medioambiental* (Garrido Frenich, 2010). Los principales residuos contaminantes procedentes de los medicamentos y presentes en los animales destinados al consumo humano son los antibióticos. Su uso como estimulantes de la producción animal está justificado desde 1996, cuando la Federación Europea de Zootecnistas señaló las siguientes ventajas:

- Incremento de la ganancia media diaria de las producciones animales entre un 5% y un 15%.
- Incremento del índice de conversión del pienso (alrededor de un 10%), y ahorro de energía metabolizable.
- Aceleración del crecimiento, acercando la tasa de crecimiento al potencial genético.
- Consumo de menor cantidad de alimento por kilogramo de ganancia corporal.

- Menor morbilidad y menor mortalidad.
- Mayor homogeneidad de lotes.
- Mejor adaptación a nuevos ambientes microbianos. Las mejoras persisten en manadas sucesivas y en muchas granjas.
- Mejora del crecimiento en aves jóvenes en un 5-10%.
- Relación positiva eficacia/coste (Walton, 1996; Hernández-Rodríguez & Sastre-Gallego, 1999).

Como se ha indicado, el uso de antibióticos a dosis subterapéuticas es un factor crítico en la selección de resistencia, ya que puede promover la selección y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos y de genes de resistencia. Adicionalmente a los antibióticos promotores del crecimiento, la medicación en masa, empleada frecuentemente en veterinaria para tratar simultáneamente a varios individuos, generalmente administrando el antibiótico en el agua de bebida, es un procedimiento que favorece la emergencia y la diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos (Teale, 2002; WHO, 2009).

La administración de dosis bajas de antibióticos durante largo tiempo crea las condiciones ideales para la inducción o, al menos, para la selección, de resistencias, lo que constituye el principal argumento de los defensores de la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento. Si bien no se ha establecido claramente una relación directa entre el uso de antibióticos promotores del crecimiento y el aumento de resistencias bacterianas a los antibióticos, existen múltiples estudios que sugieren esta relación basándose en evidencias circunstanciales (Bywater, 2005), habiéndose puesto de manifiesto un paralelismo en el tiempo entre el aumento de bacterias resistentes en la microbiota intestinal animal y humana y el uso de dichos compuestos (ya sean los mismos antimicrobianos o compuestos pertenecientes al mismo grupo químico) (Cepero Briz, 2006). En la Tabla 2 se observa la evolución del uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento en la Unión Europea.

Tabla 2. Evolución de la situación de los antibióticos promotores del crecimiento (APC) en Europa (adaptado de Edqvist & Pedersen, 2001; Cepero Briz, 2006).

FECHA	ACONTECIMIENTO
1945-1960s	Primeras advertencias del riesgo de desarrollo de resistencias bacterianas, y demostración de su transmisión vertical y horizontal.
1960s	Comienza el uso de antibióticos (penicilina, estreptomina, tetraciclinas...) en piensos para la promoción del crecimiento.
1969	El Comité Swann recomienda imponer restricciones al uso de antimicrobianos en pienso, para permitir sólo aquellos no usados como terapéuticos en medicina humana y veterinaria.
1970s	La mayoría de las recomendaciones Swann se llevan a la práctica en el Reino Unido y en la CEE.
1975	Relajación de las recomendaciones Swann; se permite el uso como APC de espiramicina y tilosina, a pesar de tener análogos estructurales en medicina humana.
1984	Los ganaderos suecos solicitan a su gobierno la prohibición de los APC a causa de las preocupaciones de los consumidores.
1986	Prohibición de los APC en Suecia fundamentada en el desarrollo de resistencias y en sus efectos "inseguros" a largo plazo.
1993	Primeros estudios que indican una relación entre uso de avoparcina y el aumento y transmisión de enterococos resistentes a vancomicina, antibiótico del mismo grupo (glucopéptidos).
1995	Suecia y Finlandia entran en la UE, con permiso para mantener su prohibición de los APC. Prohibición de la avoparcina en Dinamarca.
1996	Prohibición de la virginamicina en Dinamarca y de la avoparcina en Alemania.
1997	La UE prohíbe la avoparcina. La OMS concluye que "es esencial sustituir el uso de APC".
1998	La UE prohíbe la ardamicina como APC por riesgos de resistencias cruzadas, y el uso desde 1999 de otros 4 antibióticos (virginamicina, bacitracina de zinc, fosfato de tilosina, espiramicina) como "medida de precaución". Dinamarca prohíbe todos los APC.
1999	El Comité científico permanente de la CE recomienda el abandono de los APC que puedan ser usados en medicina humana y veterinaria, o que promuevan resistencias cruzadas. Se prohíbe el uso de inhibidores (olaquinox, carbadox) por motivos de salud laboral.
2000	La industria farmacéutica se opone judicialmente a la decisión de la CE, sin resultado.
2001-2004	Retirada de 6 sustancias anticoccidiósicas (amprolio, amprolio + etopabato, metilclorpindol, metilclorpindol + metilbenzocuat, arprinocida, nicarbacina). Retirada de antihistomoniásicos (dimetridazol, ipronidazol, ronidazol, nifursol).
2006	Prohibición del uso de los restantes APC (avilamicina, flavofosfolipol, salinomicina, monensina). Los dos últimos podrán seguir siendo empleados en pollos como coccidiostatos.

2.2. Biocidas

2.2.1. Uso de biocidas en la Industria Alimentaria

Los biocidas se definen como “las sustancias activas y preparados que contengan una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos” (MAPAMA, 2017a). En la Tabla 3 se muestran los principales tipos de biocidas.

Tabla 3. Tipos de biocidas (fuente: Real Decreto 1054/2002; BOE, 2002).

TIPO DE PRODUCTO	DEFINICIÓN
Grupo Principal 1: Desinfectantes y biocidas generales: Estos tipos de productos excluyen los productos de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos y en polvo y productos similares.	
1	Biocidas para la higiene humana: Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene humana.
2	Desinfectantes utilizados en los ámbitos de la vida privada y de la salud pública y otros biocidas: Productos empleados para la desinfección del aire, superficies, materiales, equipos y muebles que no se utilicen en contacto directo con alimentos o piensos en zonas de la esfera privada, pública e industrial, incluidos los hospitales, así como los productos empleados como alguicidas. Las zonas de utilización incluyen, entre otras, las piscinas, acuarios, aguas de baño y otras; sistemas de aire acondicionado; paredes y suelos de centros sanitarios y otras instituciones; retretes químicos, aguas residuales, desechos de hospitales, tierra u otros sustratos (en las áreas de juegos).
3	Biocidas para la higiene veterinaria: Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene veterinaria, incluidos los productos empleados en las zonas en que se alojan, mantienen o transportan animales.
4	Desinfectantes para las superficies que están en contacto con alimentos y piensos: Productos empleados en la desinfección de equipos, recipientes, utensilios para consumo, superficies o tuberías relacionados con la producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos, piensos o bebidas (incluida el agua potable) para seres humanos o animales.
5	Desinfectantes para agua potable: Productos empleados para la desinfección del agua potable (tanto para seres humanos como para animales).
Grupo principal 2: Conservantes	
6	Conservantes para productos envasados: Productos para la conservación de productos elaborados que no sean alimentos o piensos, dentro de recipientes, mediante el control del deterioro microbiano con el fin de prolongar su vida útil.
7	Conservantes para películas: Productos empleados para la conservación de películas o recubrimientos mediante el control del deterioro microbiano con el fin de proteger

Introducción y antecedentes

	las propiedades iniciales de la superficie de los materiales u objetos como pinturas, plásticos, selladores, adhesivos murales, cubiertas, papeles, obras de arte.
8	Protectores para maderas: Productos empleados para la protección de la madera, desde la fase del aserradero inclusive, o los productos derivados de la madera, mediante el control de los organismos que destruyen o alteran la madera. Se incluyen en este tipo de productos tanto los de carácter preventivo como curativo.
9	Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados: Productos empleados para la conservación de materiales fibrosos o polimerizados, como los productos de cuero, caucho, papel o textiles y la goma mediante el control del deterioro microbiano.
10	Protectores de mampostería: Productos empleados para la conservación y tratamiento reparador de los materiales de mampostería u otros materiales de construcción distintos de la madera mediante el control del deterioro microbiano y la afectación por algas.
11	Protectores para líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales: Productos empleados para la conservación del agua u otros líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y de elaboración industrial mediante el control de los organismos nocivos, como microbios, algas y moluscos. No se incluyen en este tipo de productos los empleados para la conservación del agua potable.
12	Productos antimoho: Productos empleados para la prevención o el control de la proliferación de mohos sobre los materiales, equipos y estructuras utilizados en procesos industriales, por ejemplo, sobre la madera y pulpa de papel, estratos de arena porosa en la extracción de petróleo.
13	Protectores de líquidos de metalistería: Productos empleados para la conservación de los líquidos de metalistería mediante el control del deterioro microbiano.
Grupo principal 3: Plaguicidas	
14	Rodenticidas: Productos empleados para el control de los ratones, ratas u otros roedores.
15	Avicidas: Productos empleados para el control de las aves.
16	Molusquicidas: Productos empleados para el control de los moluscos.
17	Piscicidas: Productos empleados para el control de los peces; se excluyen de estos productos los empleados para tratar las enfermedades de los peces.
18	Insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos: Productos empleados para el control de los artrópodos (insectos, arácnidos, crustáceos, etc.).
19	Repelentes y atrayentes: Productos empleados para el control de los organismos nocivos (invertebrados como las pulgas; vertebrados como las aves) mediante repulsión o atracción, incluidos los empleados, directa o indirectamente, para la higiene veterinaria o humana.
Grupo principal 4: Otros biocidas	
20	Conservantes para alimentos o piensos: Productos empleados para la conservación de alimentos o de piensos mediante el control de los organismos nocivos.
21	Productos antiincrustantes: Productos empleados para el control de la fijación y crecimiento de organismos incrustantes (microbios o formas superiores de especies animales o vegetales) en barcos, equipos de acuicultura u otras estructuras acuáticas.
22	Líquidos para embalsamamiento y taxidermia: Productos empleados para la desinfección y conservación de cadáveres animales o humanos o de parte de los mismos.
23	Control de otros vertebrados: Productos empleados para el control de los parásitos.

Los compuestos antimicrobianos, que eliminan o inhiben el crecimiento de los microorganismos, pueden dividirse en dos grupos: antibióticos y biocidas. Los biocidas se dividen, a su vez, en diferentes grupos: desinfectantes (para reducir los niveles de contaminación microbiana en múltiples etapas de la cadena alimentaria; Davidson & Harrison, 2002), descontaminantes (para reducir la prevalencia y/o niveles microbianos, especialmente de microorganismos patógenos, en alimentos frescos, principalmente carne y productos vegetales) y aditivos (que se añaden a los alimentos para retardar su alteración y reducir el riesgo para el consumidor) (Tabla 2). Por lo que respecta al último grupo de compuestos, cada agente biocida que se emplea como aditivo en la Industria Alimentaria debe superar una serie de pruebas toxicológicas con el fin de poder definir su límite permisible en los alimentos (Esimbekova *et al.*, 2017).

Los biocidas más empleados en la Industria Alimentaria pertenecen a los siguientes grupos químicos: alcoholes, aldehídos, biguanidas, compuestos de cloro y yodo, compuestos de peróxido, fenoles y compuestos de amonio cuaternario (Andersen, 2016). Entre los compuestos de amonio cuaternario, el cloruro de benzalconio se utiliza ampliamente como desinfectante y agente tensioactivo catiónico para realizar la limpieza y desinfección de las líneas de producción y superficies de las industrias alimentarias (Fernández Márquez *et al.*, 2017). Es de destacar también el uso generalizado del hipoclorito sódico.

Durante siglos, los biocidas se han empleado empíricamente de varias formas. Algunos ejemplos de ello son el uso de recipientes de cobre y plata para almacenar agua potable, vinagre, sales y especias utilizados como método de conservación de la carne y pescado, o los bálsamos. Una vez descubiertos los microorganismos, se desarrollaron métodos de preservación química y desinfección (Ortega Morente *et al.*, 2013). Hoy en día los biocidas se emplean en la Industria Alimentaria como aditivos alimentarios, descontaminantes o desinfectantes ambientales, para eliminar los microorganismos patógenos, reduciendo el riesgo de que se produzcan enfermedades transmitidas por alimentos (Molina-González *et al.*, 2014; Andersen, 2016; Esimbekova *et al.*, 2017). Los agentes desinfectantes pueden ser físicos o químicos. El *Codex Alimentarius* define “desinfección” como *la reducción, mediante agentes físicos o químicos, del número de microorganismos en el medio ambiente, a un nivel que no comprometa la inocuidad o idoneidad de los alimentos*.

La desinfección física incluye el empleo de altas temperaturas (como vapor) irradiación (p. ej. luz ultravioleta), etc. Estos métodos son muy eficaces y no dejan

residuos. Sin embargo, no siempre es posible emplearlos, siendo necesario el empleo de desinfección química (Andersen, 2016). Actualmente existe una gran versatilidad de biocidas químicos, con toxicidad limitada sobre los tejidos animales, como es el caso del amonio cuaternario o de los bisfenoles. Esto ha dado lugar a un incremento del empleo de biocidas en las industrias de los alimentos (Gadea *et al.*, 2017).

Existen múltiples mecanismos por los que actúan los biocidas, como modificación de la estructura y composición de la membrana celular, cambios en la fluidez de la membrana, biodegradación, etc. (Gadea *et al.*, 2017). Se trata de moléculas con distintos mecanismos de acción, que dañan la membrana citoplasmática, ácidos nucleicos o ribosomas de los microorganismos y, en general, tienen más de un lugar diana (Rizzotti *et al.*, 2016). La diferencia principal entre antibióticos y biocidas es que los primeros poseen un lugar específico de acción, mientras que los biocidas pueden afectar a múltiples sitios blanco (Gilbert & McBain, 2003; Meyer & Cookson, 2010).

En las últimas décadas se ha observado una reducción de la sensibilidad de las bacterias patógenas a los antimicrobianos, que en cierto modo podría estar relacionada con el uso de biocidas (Gadea *et al.*, 2017). Existen múltiples ocasiones en que los biocidas se emplean a concentraciones subletales en la Industria Alimentaria (p. ej. concentración errónea o distribución heterogénea, incorrecto almacenamiento, uso de aditivos a dosis bajas-teoría de vallas). Algunas evidencias científicas recientes sugieren que la presión selectiva ejercida por el empleo de biocidas podría dar lugar a la emergencia de mecanismos de resistencia a antibióticos, incluyendo resistencia cruzada, co-resistencia, selección de clones (resistentes tanto a biocidas como a antibióticos) o activación de la respuesta SOS (Capita & Alonso-Calleja, 2013; Molina-González *et al.*, 2014). En consecuencia, en los últimos años se ha planteado la preocupación de que, en determinadas circunstancias, las bacterias pueden incrementar su resistencia a algunos biocidas, a la vez que una sensibilidad reducida a los biocidas puede inducir resistencia a antibióticos (Gadea *et al.*, 2017).

En este contexto es muy relevante el estudio de nuevos compuestos antimicrobianos que pueden controlar el crecimiento y la propagación de los microorganismos patógenos (Oliveira *et al.*, 2017). Es también muy importante educar correctamente al personal de las fábricas que realiza las tareas de limpieza y desinfección, para que emplee los agentes adecuados, siguiendo al pie de la letra las indicaciones de los fabricantes en cuanto a concentración y tiempos de contacto correctos. De este modo podrá minimizarse el desarrollo de resistencias a los distintos

compuestos antimicrobianos (Andersen, 2016). Los productos naturales han sido considerados alternativas prometedoras a los agentes antimicrobianos utilizados actualmente, no sólo por sus propiedades antimicrobianas, sino también por la dificultad de desarrollar resistencia frente a ellos, principalmente debido a su capacidad para actuar en múltiples lugares diana (Oliveira *et al.*, 2017). Ejemplo de ello son los aceites esenciales, una importante fuente de compuestos antimicrobianos (Gadea *et al.*, 2017).

Hasta ahora no disponemos de ningún desinfectante disponible con todas las características deseables (Andersen, 2016). Estas propiedades se indican en la Tabla 4. Por otro lado, existen unos factores que influyen la capacidad de acción de los desinfectantes sobre las superficies de la Industria Alimentaria, como el tiempo de contacto, la temperatura de aplicación, la concentración (siendo un cálculo incorrecto de ésta la principal causa de una desinfección inadecuada). En cuanto a lo que depende de los microorganismos, la eficacia de los biocidas se ve afectada por el número (la contaminación microbiana intensa es más difícil de desinfectar), el tipo (los microorganismos varían en susceptibilidad a los biocidas, siendo los priones y las esporas los más resistentes a la desinfección), el fenotipo (los microorganismos que crecen como *biofilms* o con un metabolismo bajo son más resistentes a los antimicrobianos que los que crecen en modo planctónico y aquellos que crecen en medios “ricos”) o su localización. En la práctica, además de los factores enumerados, también influye enormemente la eficacia de la fase de limpieza previa de las superficies de trabajo que deben ser desinfectadas (Maillard, 2016).

Tabla 4. Principales características deseables de los desinfectantes (Maillard, 2016).

En relación con la actividad antimicrobiana.
<ul style="list-style-type: none">✓ Disponer de actividad de amplio espectro, incluyendo actividad frente a bacterias, hongos, virus y esporas.✓ Rápida actividad antimicrobiana.✓ Conservar la estabilidad (producto) y la eficacia antimicrobiana en una amplia gama de pHs.✓ Conservar la estabilidad (producto) y la eficacia antimicrobiana en una amplia gama de temperaturas.✓ Retener la actividad en presencia de carga orgánica y agua dura.✓ Retener la actividad tras su dilución.✓ Tener actividad residual.
En relación con la seguridad.
<ul style="list-style-type: none">✓ Carecer o poseer baja toxicidad.✓ Carecer o poseer baja irritabilidad.✓ No ser inflamable.✓ Ser degradable en el medio ambiente.
En relación con la formulación y el uso.
<ul style="list-style-type: none">✓ No manchar.✓ Carecer o poseer baja corrosividad.✓ Carecer de olor.✓ Buena humectación y detergencia.✓ Fácil combinación con líquidos o polvos.✓ Compatible con otros productos químicos (p. ej. tensioactivos).✓ Ser rentable.

2.2.2. *Biocidas de uso alimentario: hipoclorito sódico (HIP), fosfato trisódico (FTS) y cloruro de benzalconio (CB)*

Hipoclorito sódico

El hipoclorito sódico (HIP) es uno de los desinfectantes más ampliamente utilizados en la Industria Alimentaria, ya que posee muchos de los requisitos del

desinfectante ideal (Fukurazi, 2006). En la Tabla 5 se muestran las principales ventajas e inconvenientes de este desinfectante.

Cabe destacar su amplio espectro de actividad microbicida, ya que puede actuar como bactericida, fungicida, esporicida, tuberculicida y virucida (SDS, 2011).

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes del uso de hipoclorito sódico en procesos de limpieza y desinfección (Fukurazi, 2006; Chamakura et al., 2011).

VENTAJAS	INCONVENIENTES
<ul style="list-style-type: none"> ○ Amplio espectro antibacteriano. ○ Rápida acción bactericida. ○ Soluble en agua; fácil de usar. ○ Estabilidad relativa en soluciones concentradas y diluidas. ○ Incidencia de toxicidad baja. ○ Reducido a ion cloruro como resultado de la acción de oxidación. ○ Bajo coste. ○ Acciones de limpieza, desodorización y blanqueo. ○ No dejan residuos tóxicos. ○ No son afectados por la dureza del agua. ○ Eliminan los microorganismos y <i>biofilms</i> secos o fijados en las superficies. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Irritación de las membranas mucosas. ○ Olor cuando se usa en soluciones concentradas. ○ Descenso de la eficacia en presencia de cargas orgánicas. ○ Corrosividad a los metales en altas concentraciones (> 500 ppm). ○ Elevada tensión superficial. ○ Inactivación por la materia orgánica. ○ Decoloración o blanqueo de telas. ○ Generación de gas tóxico cloro cuando se mezcla con amoníaco o ácido (p. ej. agentes de limpieza).

De acuerdo con un estudio sobre el mecanismo de acción del hipoclorito sódico (Estrela et al., 2002), este compuesto es capaz de transformar los ácidos grasos de la materia orgánica en sales de ácidos grasos (jabones) y glicerol (C₃H₈O₃), por medio de reacciones de saponificación (Figura 19), produciéndose así una reducción de la tensión superficial de la solución remanente, lo cual puede provocar la disolución de la superficie bacteriana. Además, el hipoclorito de sodio neutraliza los aminoácidos, formando agua y sales por medio de la reacción de neutralización. Con la disminución de iones hidroxilo (OH⁻) mediante la formación de agua, se reduce el pH, estimulando la presencia de

ácido hipocloroso que en contacto con componentes orgánicos actúa como solvente, libera cloro que se combina con el grupo amino de las proteínas, formando cloraminas, que interfieren con el metabolismo celular normal. El ácido hipocloroso y los iones hipoclorito (OCl⁻) conducen a la degradación e hidrólisis de los aminoácidos. La acción de los iones hidroxilo y de la reacción de cloraminación promueve la inactivación irreversible de enzimas esenciales para la célula, permitiendo de este modo la actuación del hipoclorito de sodio como antimicrobiano.

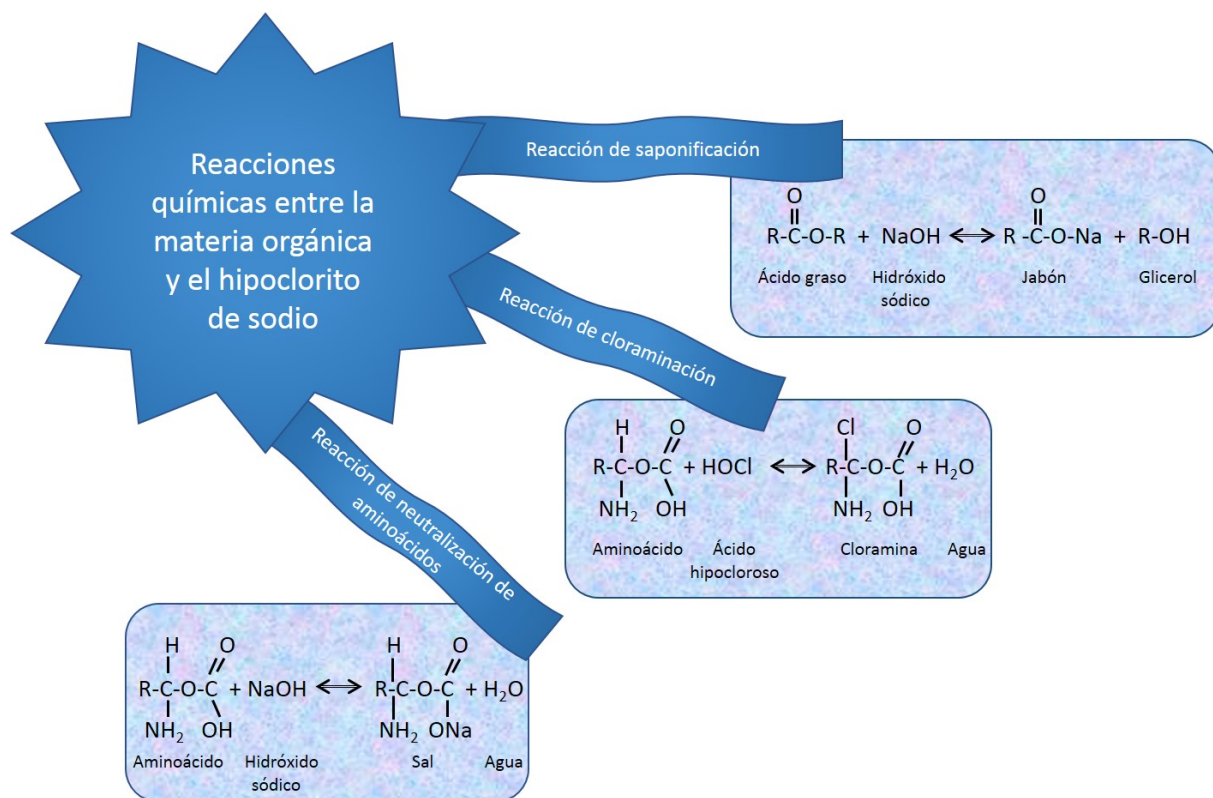


Figura 19. Reacciones químicas que ocurren entre la materia orgánica y el hipoclorito sódico (adaptado de Estrela *et al.*, 2002).

La forma biocida más eficaz, el ácido hipocloroso (HOCl), necesita la presencia de un átomo de hidrógeno (H), que toma del agua. Para preservar su eficacia biocida es necesario mantener las superficies húmedas, pues a medida que estas se secan, el agua desaparece, y la reacción se desplaza hacia la forma menos eficaz (OCl⁻). Por ello, es necesario conservar las superficies húmedas durante el tiempo de contacto previsto para lograr la máxima eficacia biocida y esporicida; en caso contrario no se producirán más que vapores de cloro, sin el efecto desinfectante deseado (Betelgeux, 2017).

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas no formadoras de esporas son altamente susceptibles al cloro. Los productos clorados tienen capacidad de penetración limitada, razón por la cual son superados por otros desinfectantes, como los compuestos de amonio cuaternario, cuando es preciso desinfectar áreas porosas (Aldana & Sarassa, 1999).

Fosfato trisódico

El fosfato trisódico (FTS) es un producto utilizado como ablandador de agua, desengrasante, removedor de manchas y agente de limpieza. En la Industria Alimentaria posee diversas utilidades como son: aditivo de varios alimentos, regulador del pH, emulsificante, espesante, agente secuestrante y suplemento nutritivo (Nitromex, 2017). Particularmente en las industrias cárnicas, el FTS se utiliza como un aditivo alimentario, comúnmente empleado en diversos productos cárnicos, como regulador del pH, agente quelante y emulsionante (Cubero *et al.*, 2002).

Según el *Codex Alimentarius*, un "aditivo alimentario" es *cualquier sustancia que por sí misma no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al alimento en sus fases de producción, fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte (o pueda esperarse, razonablemente, que resulte) directa o indirectamente, por sí o sus subproductos, un componente del alimento o bien afecte a sus características*. Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales (FAO, 2017). Además, en el caso de los biocidas, se pueden añadir a los alimentos con la intención de inhibir el crecimiento de los microorganismos alterantes y prolongar su vida útil, así como para ejercer un control sobre los microorganismos patógenos responsables de infecciones e intoxicaciones alimentarias (Davidson & Zivanovic, 2003).

En los Estados Unidos, el FTS fue declarado sustancia GRAS (*Generally Recognized As Safe*) en 1992, utilizándose, sobre superficies de canales o despieces de aves, como procedimiento de descontaminación en los mataderos (a una concentración del 8-12%) (FDA, 2012) debido a su capacidad para remover películas de grasa y a su efecto surfactante o detergente que contribuye también a la acción antimicrobiana del FTS (Capita *et al.*, 2002).

Cloruro de benzalconio

El cloruro de benzalconio (CB) es un compuesto de amonio cuaternario (*quaternary ammonium compound*; QAC). Está formado por aminas cuaternarias de cadena larga. Su estructura química combina cadenas lineales largas (lipofílicas) con una parte iónica (hidrofílica), lo cual confiere un carácter tensioactivo al compuesto, pudiendo ejercer una acción detergente, aunque su función principal es como desinfectante (AECOSAN, 2015).

Los compuestos de amonio cuaternario se introdujeron a finales de la década de 1930 y se han utilizado principalmente en formulaciones desinfectantes y antisépticas utilizadas en instalaciones relacionadas con la salud humana y animal, agricultura e industria. Actualmente los compuestos de amonio cuaternario son la clase principal de tensioactivos catiónicos utilizados como ingredientes en suavizantes de tejidos, desinfectantes, biocidas, detergentes, agentes de transferencia de fases y numerosos productos de cuidado personal. Son eficaces frente a una gran variedad de bacterias, hongos y virus a concentraciones muy bajas (Tezel & Pavlostathis, 2015).

Esta sal de amonio cuaternario se encuentra comercializada como mezcla de cloruros de alquildimetil (bencil) amonio, de pesos moleculares variables dependiendo de la longitud de los grupos alquílicos (Müller *et al.*, 2013). Es bactericida, fungicida y virucida (Betelgeux, 2017), de consistencia semisólida amarillenta, soluble en agua, etanol y acetona. La actividad microbicida de los compuestos de amonio cuaternario se explica por su carácter catiónico, que interfiere con las membranas biológicas, determinando cambios de estructura y permeabilidad (Müller *et al.*, 2013). Desarrolla su actividad tanto sobre el medio ácido como alcalino, aunque en este último presenta mayor efectividad. La longitud de las cadenas alquílicas es determinante del poder microbicida. Sin embargo, los resultados no son extrapolables de unos compuestos a otros. En los cloruros de benzalconio las cadenas de entre 14 y 16 átomos son las más efectivas, mientras que en las sales dialquílicas son las cadenas de menos átomos de carbono las que presentan mayor comportamiento microbicida (Betelgeux, 2017). Las concentraciones de uso son variables según la especie microbiana a tratar, siendo aconsejable efectuar pruebas preliminares para determinarla, si bien se ha verificado una óptima acción biocida a una concentración del 5% (Müller *et al.*, 2013).

El mecanismo básico de acción de este agente implica a las membranas biológicas como diana o *target* primario, con la siguiente secuencia común de acontecimientos tras

interactuar con la membrana citoplasmática; se produce la desorganización de los lípidos de membrana y/o la alteración del metabolismo energético de la célula microbiana; a continuación, tiene lugar la salida de componentes de bajo peso molecular (pérdida de la permeabilidad selectiva), seguido de la degradación de moléculas de alto peso molecular (proteínas, ácidos nucleicos), finalizando con la lisis celular mediada por enzimas autocatalíticas (Azanza *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción se complica cuando los QACs se encuentran en concentraciones inferiores a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), en cuyo caso pueden tener lugar múltiples procesos, como la pérdida de osmorregulación de la membrana, la inhibición de las enzimas respiratorias y el estrés oxidativo (Ceragioli *et al.*, 2010; Blázquez *et al.*, 2012). El mecanismo más extendido que conduce a la disminución de la susceptibilidad a QACs es el aumento de la síntesis de bombas de expulsión (Poole, 2005), aunque pueden estar involucrados otros mecanismos como la alteración de la composición de los ácidos grasos y diferentes cambios en la membrana bacteriana (Guerin-Mechin *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2011). En efecto, hay múltiples mecanismos que se desarrollan conjuntamente durante la adaptación de las bacterias a los QACs (Figura 20), como modificación de la estructura y composición de la membrana celular, mejora de la formación de *biofilm*, adquisición de genes que codifican para bombas de expulsión, sobreexpresión de sistemas de bombeo y biodegradación (Moen *et al.*, 2012).

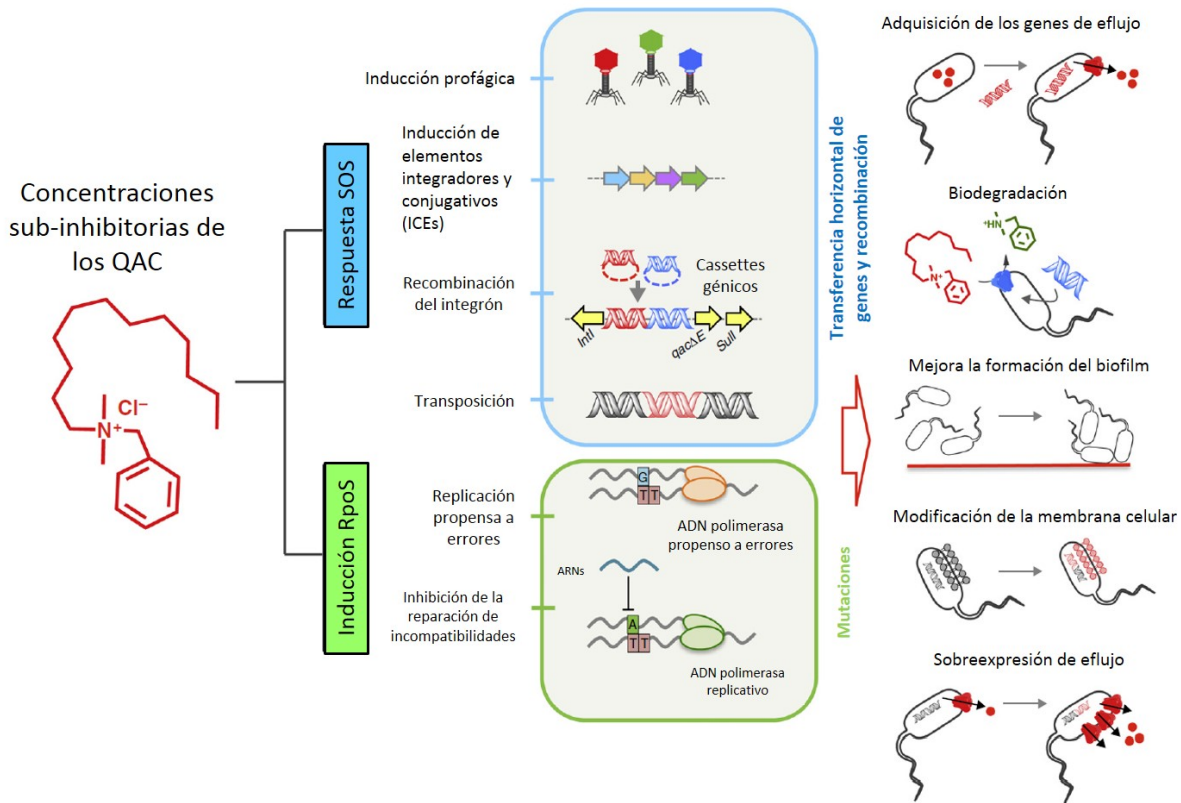


Figura 20. Vías y mecanismos de resistencia en amonios cuaternarios (adaptado de Tezel & Pavlostathis, 2015).

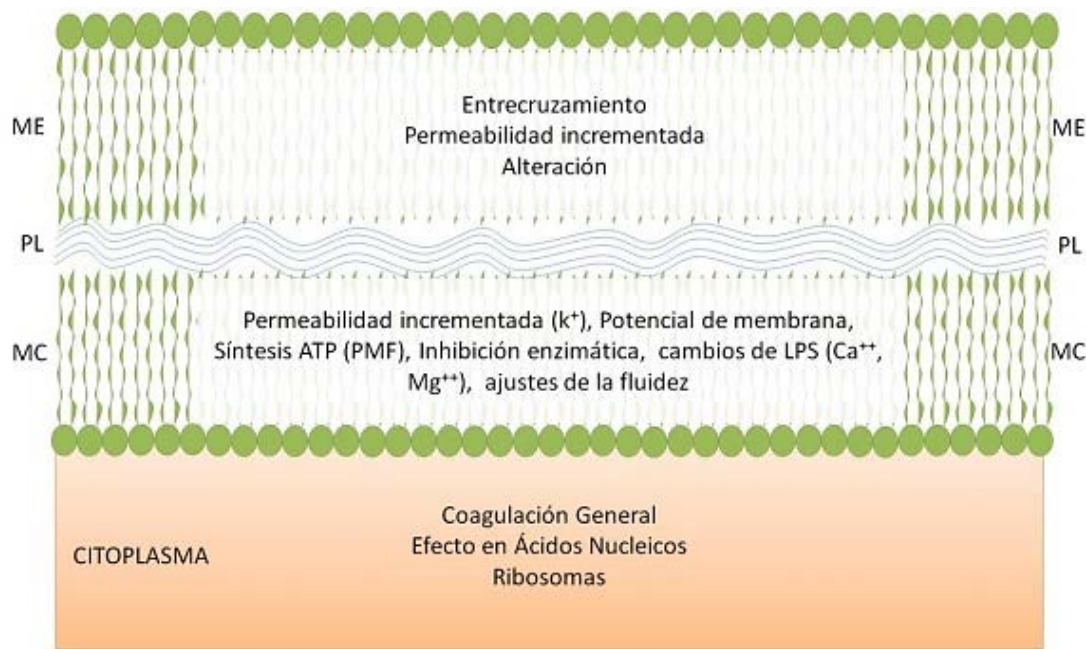
2.2.3. Adaptación de las bacterias a los biocidas: causas y consecuencias.

El uso frecuente de biocidas en entornos alimentarios ha generado preocupaciones sobre el potencial de los microorganismos para desarrollar una susceptibilidad reducida a estos compuestos como un mecanismo de adaptación a las condiciones ambientales (Alonso-Calleja *et al.*, 2015). Los biocidas son normalmente de amplio espectro, por lo que tienen varios lugares diana. Si la concentración de un biocida es demasiado baja (subinhibitoria) o el tiempo de contacto es demasiado corto, puede que solamente actúe en un sitio diana, lo cual incrementa el riesgo de resistencia causada por procesos adaptativos de los microorganismos, que son capaces de bloquear el acceso al biocida (Andersen, 2016). Es cada vez más evidente que la eficacia de los biocidas puede ser cuestionable en algunas circunstancias y existe una preocupación creciente por el uso imprudente de los biocidas, que podría permitir la exposición de las bacterias a concentraciones subletales de tales compuestos (Alonso-Calleja *et al.*, 2015). Se ha observado una similitud entre la forma en que las bacterias son capaces de resistir a los antibióticos y a los biocidas (Braoudaki & Hilton, 2004).

La respuesta de adaptación microbiana debida a situaciones de estrés subletal puede conducir a una susceptibilidad reducida a diferentes situaciones de estrés diferentes, incluyendo antibióticos (protección cruzada o adaptación cruzada) (Alonso-Calleja *et al.*, 2015). En varios estudios se ha demostrado que el crecimiento de distintos microorganismos patógenos en presencia de concentraciones subinhibitorias de desinfectantes da lugar a un aumento en la detección de resistencias múltiples (Randall *et al.*, 2007).

Los mecanismos generales de interacción del biocida con los microorganismos se pueden dividir en tres grupos (Andersen, 2016), en función de la estructura a la que afecta el biocida (Figura 21):

- **componentes extracelulares externos:** en caso de las bacterias Gram-negativas, el principal efecto del biocida debe centrarse en disminuir la hidrofobicidad de la membrana externa, aumentando así la posibilidad de que el biocida llegue al citoplasma,
- **membrana citoplasmática:** es el principal sitio diana, ya que es donde se encuentran numerosas enzimas que regulan diversos procesos metabólicos de las células. Los principales mecanismos de acción de los biocidas están en relación con alteración de la membrana, interacción con la fuerza motriz de protones e inhibición enzimática,
- **componentes citoplasmáticos:** principalmente ácidos nucleicos, ribosomas, enzimas, etc. Generalmente los componentes citoplasmáticos no son el principal objetivo diana de los biocidas.



ME, membrana externa; PL, periplasma; MC, membrana citoplasmática; ATP, adenosín trifosfato; PMF, fuerza de movimiento de protones; LPS, lipopolisacáridos.

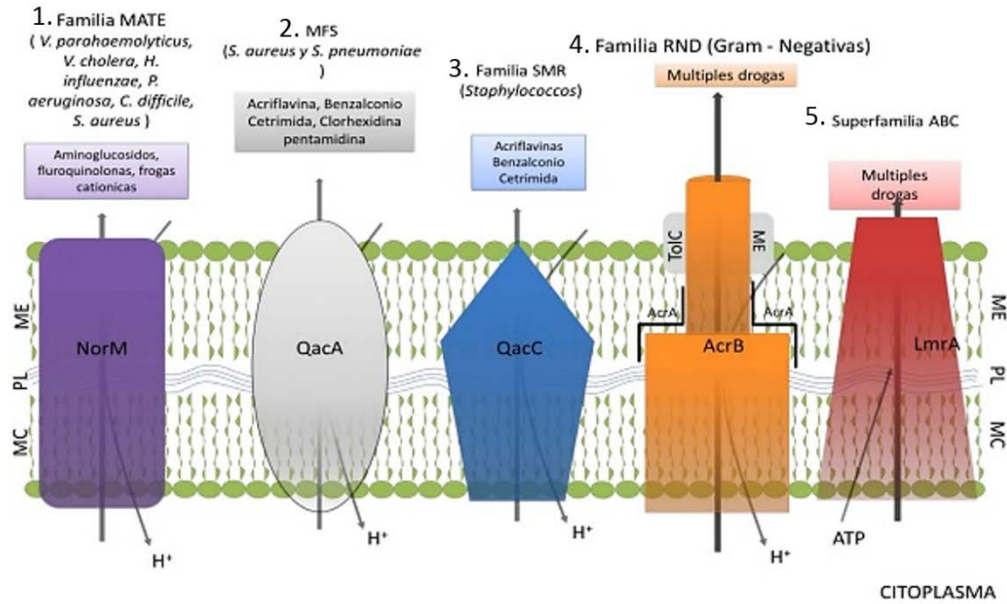
Figura 21. Lugar de acción y efecto de los biocidas en las células bacterianas (Pardo Hernández, 2014).

Entre los principales mecanismos de adaptación se incluyen la disminución de la acumulación de compuestos, la disminución de la permeabilidad, la modificación del lugar diana y la modificación del propio compuesto. Los sistemas de bombas de expulsión activas están también cada vez más implicados en la resistencia a los biocidas. Por lo tanto, parece perfectamente factible que la exposición y el desarrollo de la resistencia a un agente antimicrobiano puedan inducir mecanismos de resistencia frente a otros compuestos (Braoudaki & Hilton, 2004). Los principales mecanismos que implican una susceptibilidad reducida a los biocidas se indican a continuación.

- **Permeabilidad de las cubiertas celulares:** la barrera de permeabilidad permite una susceptibilidad reducida debido a la estructura química y composición de las capas celulares externas. Esta susceptibilidad es variable y tiene carácter cromosómico (Palmer *et al.*, 2013). Las bacterias Gram-positivas son más susceptibles, ya que no tienen capas recubriendo a la de peptidoglicanos. Los biocidas compuestos por moléculas pequeñas, como alcoholes, fenoles, QAC, etc., pueden atravesar fácilmente la capa de peptidoglicanos, por lo que las bacterias Gram-positivas son más susceptibles a estos biocidas (Poole, 2002).

Cabe señalar que el grupo *Mycobacteria* es el más resistente, debido a que posee una pared celular compleja con una capa peptidoglicano-polisacárido, una capa cerosa y otra lipídica. Asimismo, las endosporas de bacilos y clostridios los hacen muy resistentes a los biocidas (Andersen, 2016).

- **Formación de biofilm:** como se comentará con detalle posteriormente, se trata de comunidades organizadas, englobadas en sustancias poliméricas extracelulares: principalmente polisacáridos y proteínas (75-89%), lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y agua (Sutherland, 2001). Esta matriz extracelular protege de amenazas del exterior, como biocidas. La posición de las bacterias en el *biofilm* determinará su susceptibilidad. Los *biofilms* que tienen la posibilidad de adherirse firmemente a la superficie son más resistentes al ataque con biocidas (Tabak *et al.*, 2007). Las bacterias tienen un sistema de comunicación que facilita la adaptación a ambientes cambiantes mediante la modulación de la expresión génica (Daniels *et al.*, 2004). La comunicación se lleva a cabo a través de pequeñas moléculas señal autoinductoras (*quorum sensing*), que se acumulan alrededor de las células en crecimiento. Cuando la concentración es alta, se inicia la expresión de genes implicados en la formación del *biofilm*. Hay muchos tipos de *biofilms* diferentes y en función de las condiciones ambientales un solo tipo de bacterias puede formar diversas clases (Andersen, 2016).
- **Bombas de expulsión:** para disminuir la concentración intracelular de un biocida, las bacterias pueden usar sistemas de bombeo de múltiples fármacos para expulsar el biocida fuera de la célula microbiana. Esto da lugar a una disminución de la concentración intracelular del biocida que llega al sitio diana y puede dar lugar a tolerancia bacteriana (Andersen, 2016). Existen mutaciones relacionadas con una expresión incrementada de las bombas de expulsión. Se ha demostrado que las bombas de expulsión son necesarias para la resistencia intrínseca a algunos desinfectantes y que la exposición a desinfectantes puede inducir la expresión de algunos sistemas de expulsión (Braoudaki & Hilton, 2004). La importancia de las bombas de expulsión en el desarrollo de la resistencia bacteriana a un biocida es incierta y puede dar lugar únicamente a una susceptibilidad modestamente reducida (Andersen, 2016). Las diferentes bombas de expulsión se pueden dividir en 5 grupos (Figura 22).



ME, membrana externa; PL, periplasma; MC, membrana citoplasmática; ATP, adenosín trifosfato.

Figura 22. Presentación de cinco bombas de expulsión ubicadas en células bacterianas (Pardo Hernández, 2014).

- 1- La familia de exclusión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE).
- 2- La superfamilia facilitadora principal (MFS).
- 3- La familia de resistencia a multidrogas de pequeño tamaño (SMR).
- 4- La familia de la resistencia-nodulación-división (RND).
- 5- La familia de cassette de unión de ATP (ABC).

Algunos organismos son resistentes a ciertos agentes antimicrobianos debido a sus características metabólicas innatas (resistencia intrínseca o natural), mientras que otros pueden desarrollar mecanismos para protegerse (resistencia adquirida) (Bower & Daeschel, 1999; Braoudaki & Hilton, 2004; Andersen, 2016; Casado Muñoz *et al.*, 2016).

Resistencia adquirida:

- **mutación:** en ocasiones se producen mutaciones que pueden dar lugar a un cambio en una enzima o estructura celular. Como resultado de ello, se modifica la efectividad o afinidad de uno o más lugares diana de los biocidas (Andersen, 2016). Generalmente la mutación no es muy frecuente en las bacterias, pero el número de mutaciones se dispara en condiciones adversas, produciéndose una hipermutación. Si a esto le sumamos la capacidad de las bacterias para transferir

los genes mutados, se entiende la rápida diseminación de la capacidad de resistencia que adquieren las poblaciones bacterianas (Bower & Daeschel, 1999)

- **adquisición de genes:** las bacterias son capaces de adquirir resistencia mediante la transferencia horizontal de genes. Los genes que codifican la resistencia a los biocidas pueden ser portados en plásmidos, transposones o integrones, actuando como vectores para transferir genes entre miembros de la misma especie bacteriana o entre bacterias de diferentes especies o géneros (Andersen, 2016). En el contexto de la resistencia a antibióticos, una de las mayores preocupaciones es la posibilidad de transferencia horizontal de genes, debido al gran potencial de diseminación horizontal de los genes de resistencia a otras bacterias, incluso de otros géneros diferentes (Casado Muñoz *et al.*, 2016).

La base genética para el desarrollo de resistencias depende de la aptitud genética de cada cepa bacteriana (Casado Muñoz *et al.*, 2016). Como se ha indicado, el uso inadecuado de biocidas puede contribuir al desarrollo de mecanismos de resistencia microbiana, habiéndose demostrado que la adaptación a un biocida puede conferir susceptibilidad reducida a otros biocidas diferentes (Braoudaki & Hilton, 2004). Existe un flujo entre diferentes ambientes de resistencia bacteriana, biocidas y antibióticos, como podemos observar en la Figura 23.

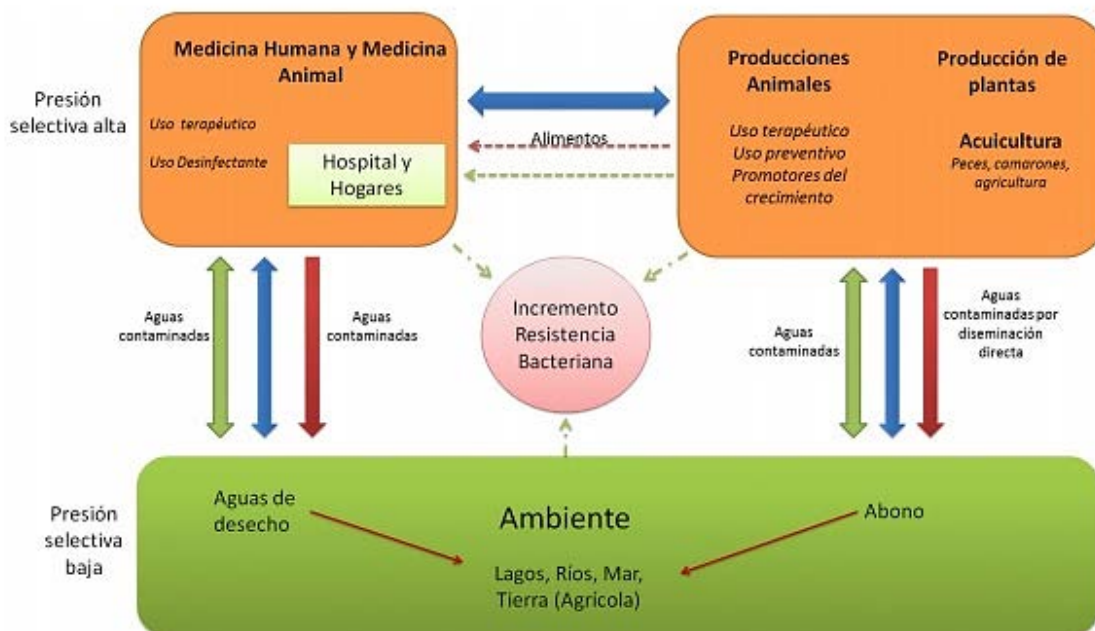


Figura 23. Representación del flujo de resistencia bacteriana (azul), antibióticos (rojo) y biocidas (verde), entre diferentes ambientes y áreas de uso (Pardo Hernández, 2014).

3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

3.1. Historia de la resistencia a los antibióticos

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 y la introducción de las primeras sulfonamidas (1930), estos antimicrobianos han adquirido un papel decisivo en la salud y esperanza de vida humanas (Davies & Davies, 2010). El descubrimiento de la penicilina tuvo lugar, de manera casual, en 1928, por un médico de origen escocés, Alexander Fleming, quien observó que un moho contaminante había inhibido el crecimiento de una cepa de *Staphylococcus aureus* en una placa de cultivo. El moho fue identificado como *Penicillium notatum*, siendo la penicilina el compuesto químico producido por el moho responsable de la inhibición (Monnet, 2005). Posteriormente, en una entrevista publicada en el diario de *New York Times*, Alexander Fleming advirtió que el uso inapropiado de la penicilina podría provocar la selección de cepas mutantes resistentes de *Staphylococcus aureus*, que podrían provocar infecciones más severas, difíciles de tratar. Fleming estaba en lo cierto, ya que un año después del uso generalizado de la penicilina se produjo un aumento significativo de la prevalencia de cepas resistentes, y tan sólo unos años más tarde, más del 50% de las cepas de *S. aureus* de origen clínico dejaron de ser susceptibles al antibiótico (Levy, 2002).

3.2 Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antimicrobianos actúan selectivamente (toxicidad selectiva) en las funciones vitales de los microorganismos, con efectos mínimos o sin afectar las funciones del hospedador. Los diferentes agentes antimicrobianos actúan de distintas maneras, por ello, la comprensión de estos mecanismos junto con la de su naturaleza química son cruciales para entender el desarrollo de resistencia en las bacterias. En términos generales, los agentes antimicrobianos pueden tener un efecto bacteriostático o bactericida. La acción bacteriostática sólo inhibe el crecimiento o la multiplicación de las bacterias, dando tiempo al sistema inmune a eliminarlas del hospedador. Por lo tanto, la eliminación completa de la bacteria depende del sistema inmune (penicilinas, cefalosporinas, carbapenem, quinolonas, aminoglucósidos, etc.). Sin embargo, la acción bactericida inactiva la bacteria independientemente de la acción del sistema inmune del hospedador (macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, etc.) (Sosa *et al.*, 2009).

Aparte de su efecto en la bacteria, la clasificación más común de los antibióticos se realiza en función de su mecanismo de acción.

- **Inhibición de la síntesis de la pared celular.** La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna, mayor en las bacterias Gram-positivas (Dover *et al.*, 2007). En este sentido, se ha demostrado recientemente que los cambios en la fluidez de las membranas celulares pueden jugar un papel importante en la adaptación de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* a algunos descontaminantes de la carne de ave (Alonso-Hernando *et al.*, 2010).

Los β -lactámicos pertenecen a este grupo de antibióticos; entre los principales compuestos se encuentran las penicilinas (ampicilina, oxacilina, penicilina), las cefalosporinas (cefazolina, cefoxitina, ceftriaxona) y el carbapenem (imipenem). Su espectro de acción es amplio, ya que actúan tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, y su lugar diana son las denominadas proteínas de anclaje de las penicilinas. También pertenecen a este grupo los glucopéptidos, siendo los compuestos principales la vancomicina y la teicoplanina. Su espectro de acción es más reducido, ya que actúan solo en bacterias Gram-positivas. Su lugar diana es el dipéptido D-alanil-D-alanina terminal del peptidoglicano.

- **Inhibición de la síntesis proteica.** La inhibición selectiva de la síntesis proteica es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades, 30S y 50S, que contienen ARN ribosómico y diversas proteínas. Los antibióticos detienen la traducción uniéndose al ribosoma, concretamente a una de las subunidades ribosómicas, lo cual inhibe la síntesis proteica al impedir la formación del complejo de iniciación 70S.

Entre los grupos de antibióticos cuyo lugar diana es la subunidad ribosómica 30S se encuentran las tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina) y los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina y estreptomycin). En cambio, entre los antibióticos cuyo lugar diana es la subunidad ribosómica 50S se encuentran los macrólidos (eritromicina y azitromicina), los fenicoles (cloranfenicol), las estreptograminas (dalfopristina, quinupristina), las lincosaminas (clindamicina) y las oxazolidinonas (linezolid). El linezolid es bacteriostático frente a cepas multirresistentes de *S. aureus* y *Enterococcus* spp.

- **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.** La replicación y la transcripción del ADN ocurre en varias fases, en las cuales pueden actuar los antibióticos sobre enzimas, sustratos y ADN molde (lugares diana), impidiendo la síntesis del ADN. Las rifamicinas (rifampicina) bloquean la subunidad beta de la ARN polimerasa, impidiendo así el inicio de la transcripción. Las quinolonas y fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina y enrofloxacin) bloquean las topoisomerasas II (ADN girasa) y IV. Ambos grupos actúan sobre enzimas, pero hay otros grupos que actúan directamente sobre el ADN. Los nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol y ornidazol) provocan la liberación de radicales nitrito que dañan el ADN por oxidación. Los nitrofuranos (nitrofurantoína) generan derivados tóxicos que dañan el ADN (Spížek & Řezanka, 2004; Tenover, 2006; Calvo & Martínez-Martínez, 2009).
- **Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos.** La síntesis de folatos es muy importante para las bacterias, ya que estas necesitan elementos esenciales como vitaminas, aminoácidos y bases púricas y pirimidínicas que no pueden obtener del medio, a diferencia de las células eucariotas. Las sulfamidas (sulfametoxazol, sulfisoxazol) compiten por la enzima dihidropteroatosintetasa. Las dianopirimidinas (trimetoprim, pirimetamina) compiten por la enzima dihidrofolatorreductasa. El trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol) actúa en dos etapas de la síntesis de ácido fólico. Así, estos grupos antimicrobianos impiden la formación de precursores del ácido fólico (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

3.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Las bacterias son microorganismos que poseen una capacidad extraordinaria para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Además, su patogenicidad reside en la posesión de material genético que, al ser transferido a otro organismo, puede colonizar los tejidos del hospedador, invadirlos y/o producir sustancias tóxicas capaces de causar enfermedad (Betancor *et al.*, 2008). Para conseguir esta adaptabilidad y patogenicidad, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a antibióticos, entre los que se encuentran:

- **Bombas de expulsión.** Las bombas de expulsión son proteínas de transporte que eliminan activamente diferentes sustancias que penetran en la célula, reduciendo así su concentración intracelular. La función esencial de estos

sistemas es idéntica a pesar de su diversidad estructural y su fuente de energía. Dicha función es oponerse a una acumulación de varios sustratos intracelulares, como son: metales pesados, antibióticos, compuestos aromáticos, detergentes, etc. (Paulsen *et al.*, 1997). Otra característica que presentan es que pueden ser específicas para un compuesto, o pueden actuar contra varios compuestos, como por ejemplo aditivos y antibióticos (Potenski *et al.*, 2003).

Poole *et al.* (1993) documentaron el primer caso que demuestra que las bombas de expulsión contribuyen a la resistencia bacteriana intrínseca a antibióticos. La eliminación de componentes de los sistemas de expulsión de *Pseudomonas aeruginosa* conllevó que la cepa se volviese resistente a diferentes agentes antimicrobianos, como fluoroquinolonas y trimetoprim (Khameneh *et al.*, 2016).

Las bombas de expulsión son diferentes en función del tipo de bacteria. En bacterias Gram-positivas, debido a la falta de sistemas de flujo de salida en la membrana externa (de la cual carecen), éstas se ciñen solamente a una bomba de salida incrustada en la membrana citoplasmática; en cambio, en las bacterias Gram-negativas, las bombas de flujo están constituidas por complejos proteicos ternarios con una bomba transmembranal, una proteína periplásmica de unión y una porina de la membrana externa. La expresión de estos sistemas de expulsión junto con la impermeabilidad de la bacteria Gram-negativa da como resultado la resistencia natural a muchos antibióticos (Cattoir, 2004).

- **Cambios en la permeabilidad bacteriana.** En este trabajo de Tesis Doctoral se estudiaron principalmente dos microorganismos diferentes, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) y *Salmonella*. Las cepas de MRSA son microorganismos Gram-positivos cuya principal característica es poseer una gruesa pared celular alrededor de la membrana plasmática. En cambio, *Salmonella* es un microorganismo Gram-negativo, cuya característica principal es la presencia de la pared celular (capa de peptidoglicano) situada entre dos membranas. La susceptibilidad de las bacterias a determinados antimicrobianos se ve afectada por esta diferencia estructural, ya que el acceso del antimicrobiano a los sitios donde ejerce su función en la bacteria no ocurre de la misma manera en ambos grupos de bacterias. Esto provoca que cada tipo de bacteria sea susceptible a las acciones de una gama limitada de agentes antimicrobianos.

Las membranas de las bacterias Gram-negativas constituyen, a la vez que una barrera de protección frente a agentes tóxicos presentes en el medio, un grupo complejo de mecanismos que permiten el paso de moléculas imprescindibles para la bacteria. La actividad de diversos antibióticos es fuertemente dependiente de estos mecanismos de transporte de membrana, ya que éstos modulan la concentración intracelular de la molécula antibacteriana (Livermore, 2003). Un ejemplo de este tipo de resistencia es la que presenta *Serratia marcescens* al carbapenem, debido a que se produce una disminución de la penetración del antibiótico por reducción de la permeabilidad de la pared celular (Khameneh *et al.*, 2016).

- **Degradación / modificación / inactivación enzimática.** Este proceso ocurre cuando las bacterias generan una o más enzimas que degradan o modifican el antimicrobiano, provocando la inactivación del mismo. La producción bacteriana de enzimas β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico provoca resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos, como ocurre en las enterobacterias (Khameneh *et al.*, 2016). Algunos autores (Valkova *et al.*, 2001; Cloete, 2003) han observado también este mecanismo de resistencia en el caso de los biocidas (p. ej. algunas sales, parabenos o aldehídos) (SCENIHR, 2009).
- **Modificación / superproducción / desvío / alteración / protección de los lugares diana (target).** Existen mutaciones en receptores intracelulares de las bacterias que conllevan en ocasiones la pérdida del lugar diana y, consecuentemente, la pérdida de efectividad del antimicrobiano. Algunos ejemplos de este mecanismo son:
 - modificaciones en los ribosomas que provocan resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas,
 - modificaciones en la enzima ADN-girasa, que provoca resistencia a las fluoroquinolonas,
 - modificación de las proteínas de anclaje de las penicilinas, observada en algunos tipos de resistencia a antibióticos (Alanis, 2005).

Un ejemplo en el que ocurre una modificación del lugar diana es la adquisición de un gen homólogo a la diana original, como ocurre en *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), en el que la resistencia a la meticilina ocurre mediante la adquisición del elemento cassette *mec* (SCC*mec*) del cromosoma del

estafilococo, donde se encuentra el gen *mecA*, que codifica la proteína PBP2 (insensible a los β -lactámicos); esta proteína permite que la biosíntesis de la pared celular se produzca a pesar de la inhibición de la PBP nativa en presencia del antibiótico (Katayama *et al.*, 2000).

- **Modificación directa del antibiótico.** Se produce por medio de una interacción directa con el antibiótico. La inactivación del antibiótico puede ocurrir de dos maneras diferentes. Una de ellas es por la **transferencia de un grupo químico**. La adición de grupos químicos a sitios vulnerables de la molécula del antibiótico por enzimas bacterianas provoca resistencia por la prevención de la unión del antibiótico a su lugar diana, siendo un ejemplo las enzimas que modifican aminoglucósidos (fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas). En otras ocasiones se producen reacciones de **hidrólisis**, cuyo ejemplo más significativo son las β -lactamasas, que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos (Blair *et al.*, 2015).
- **Formación de biofilms.** Se trata también de un mecanismo indirecto de resistencia bacteriana. La resistencia incrementada frente a biocidas y antibióticos es una propiedad que expresan las células presentes en los *biofilms*, como se comentará con detalle a lo largo de esta Memoria (Shi & Zhu, 2009). En la Tabla 6 se observa cómo desarrollan las bacterias de los *biofilms* estos mecanismos de resistencia. Los *biofilms* microbianos constituidos por cepas patógenas son considerados como un desafío global debido a la resistencia inherente a antibióticos conferida por el hábitat. Tanto en el ámbito clínico como en el sistema alimentario, los microorganismos organizados en *biofilms* son responsables de casos y brotes de infecciones humanas. Para combatir esta organización de células se requieren altas dosis de antibióticos durante un periodo prolongado de tiempo, y estos procedimientos a menudo fracasan, contribuyendo a la persistencia de la infección. El desafío impuesto por los *biofilms* ha movilizado a investigadores de todo el mundo a proponer o desarrollar alternativas para el control de estas estructuras (Ribeiro *et al.*, 2016).

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

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

3.3.1. Tipos de resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y crecer en presencia de una molécula química que normalmente puede inactivarlos o limitar su crecimiento. En la Figura 24 se observan los diferentes mecanismos de resistencia que desarrollan las bacterias frente a los distintos grupos de antibióticos. Las bacterias pueden presentar entre dos y cuatro mecanismos de resistencia diferentes frente a un grupo determinado de antibióticos.

Resistencia intrínseca. La resistencia a un compuesto antimicrobiano específico debe ser considerada "intrínseca" o "natural" cuando es inherente a una especie bacteriana, estando presente en todas sus cepas. Estas bacterias intrínsecamente resistentes permanecen viables en presencia de un determinado compuesto antimicrobiano particular por poseer unos genes determinados en su cromosoma. Las causas de este tipo de resistencia están, en la mayoría de los casos, relacionadas con la presencia de lugares diana de baja afinidad, ausencia de lugares diana para el antimicrobiano, producción innata de enzimas que inactivan el antimicrobiano o inaccesibilidad del antimicrobiano en la célula bacteriana por una disminución de la captación del antimicrobiano (Kumar & Schweizer, 2005).

Se estima que la resistencia intrínseca presenta un potencial mínimo de propagación horizontal (entre diferentes especies bacterianas), como se demostró, por ejemplo, con el cromosoma que confiere resistencia a la vancomicina, determinante de resistencia de la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* (Tynkkynen *et al.*, 1998).

Resistencia adquirida. La resistencia a un compuesto antimicrobiano específico debe ser considerada "adquirida" si la bacteria, originalmente sensible, se convierte en resistente a un antimicrobiano específico en mayor o menor grado. Esto puede deberse a diferentes mecanismos, como la presencia de una enzima que inactiva el agente antimicrobiano (p. ej. β -lactamasas que confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos), una mutación en el lugar diana del agente antimicrobiano (p. ej. modificaciones en la ADN topoisomerasa, que confiere resistencia a quinolonas), la reducción de la unión del agente antimicrobiano, la impermeabilidad de la superficie celular (p. ej. pérdida de las proteínas porinas de la membrana externa que confiere resistencia al carbapenem), la modificación post-transcripcional o post-traducciona del lugar diana del antimicrobiano, que reduce la unión del agente antimicrobiano, la reducción de la captación del agente antimicrobiano, la expulsión del agente antimicrobiano (p. ej. bombas de expulsión que confieren resistencia a la penicilina) o la sobreproducción del lugar diana del agente antimicrobiano (Sosa *et al.*, 2009; Capita González, 2013).

De manera similar a la resistencia intrínseca, la resistencia adquirida por lo general posee un bajo potencial de propagación horizontal cuando es el resultado de una mutación cromosómica. Por el contrario, se considera que la resistencia adquirida tiene un mayor potencial de difusión horizontal cuando los genes de resistencia están presentes en elementos genéticos móviles (plásmidos y transposones) (Van Reenen & Dicks, 2011; Devirgiliis *et al.*, 2013).

Los genes de resistencia a antibióticos pueden transmitirse de una bacteria a otra (transferencia horizontal de material genético) a través de varios mecanismos (Figura 25). La transferencia de ADN por transducción (mediada por bacteriófagos) o por transformación (cuando el ADN se libera de una bacteria y es captada por otra) no son, aparentemente, mecanismos de importancia en relación con la transferencia de resistencia a los antibióticos (Ammor & Mayo, 2007). Por el contrario, la conjugación, es decir, el contacto directo de célula a célula, potencialmente puede lograr la transferencia horizontal de múltiples genes, habiéndose demostrado que es un mecanismo de transferencia de información genética entre una amplia gama de microorganismos (Courvalin, 1994).

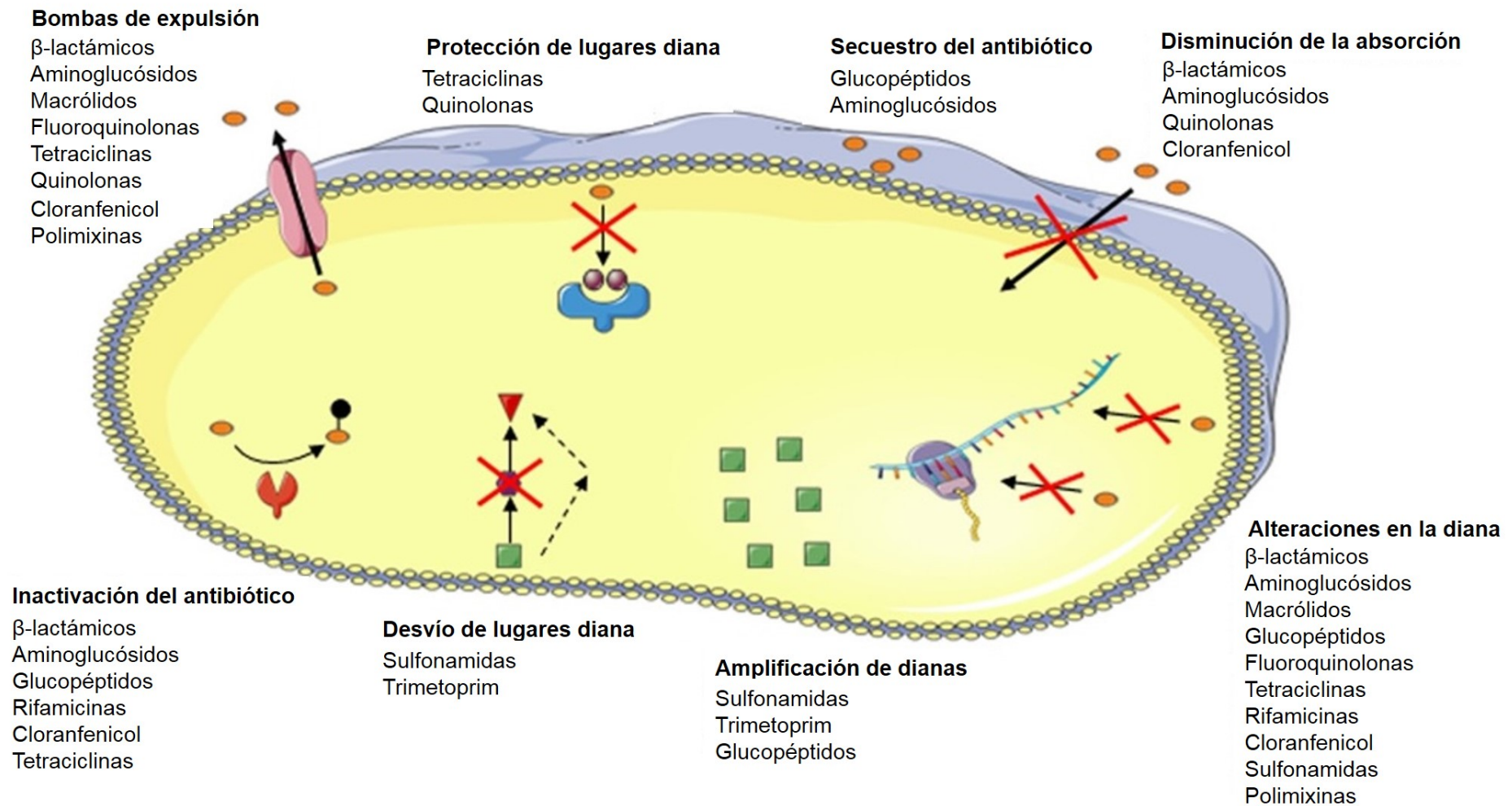


Figura 24. Mecanismos de resistencia bacteriana frente a diferentes clases de antibióticos (adaptado de Yilmaz & Özcengiz, 2016).

En la transducción intervienen bacteriófagos (virus que pueden infectar bacterias) que transfieren el ADN entre bacterias, para lo cual el ADN de la bacteria donante es ensamblado en una partícula vírica y transferido a la bacteria receptora durante la infección. La transformación es la captación de fragmentos de ADN del ambiente por una bacteria y su posterior incorporación en su cromosoma. La conjugación ocurre por medio de estructuras proteicas y tubulares denominadas *pili*, que conectan temporalmente las bacterias donante y receptora (Holmes *et al.*, 2016).

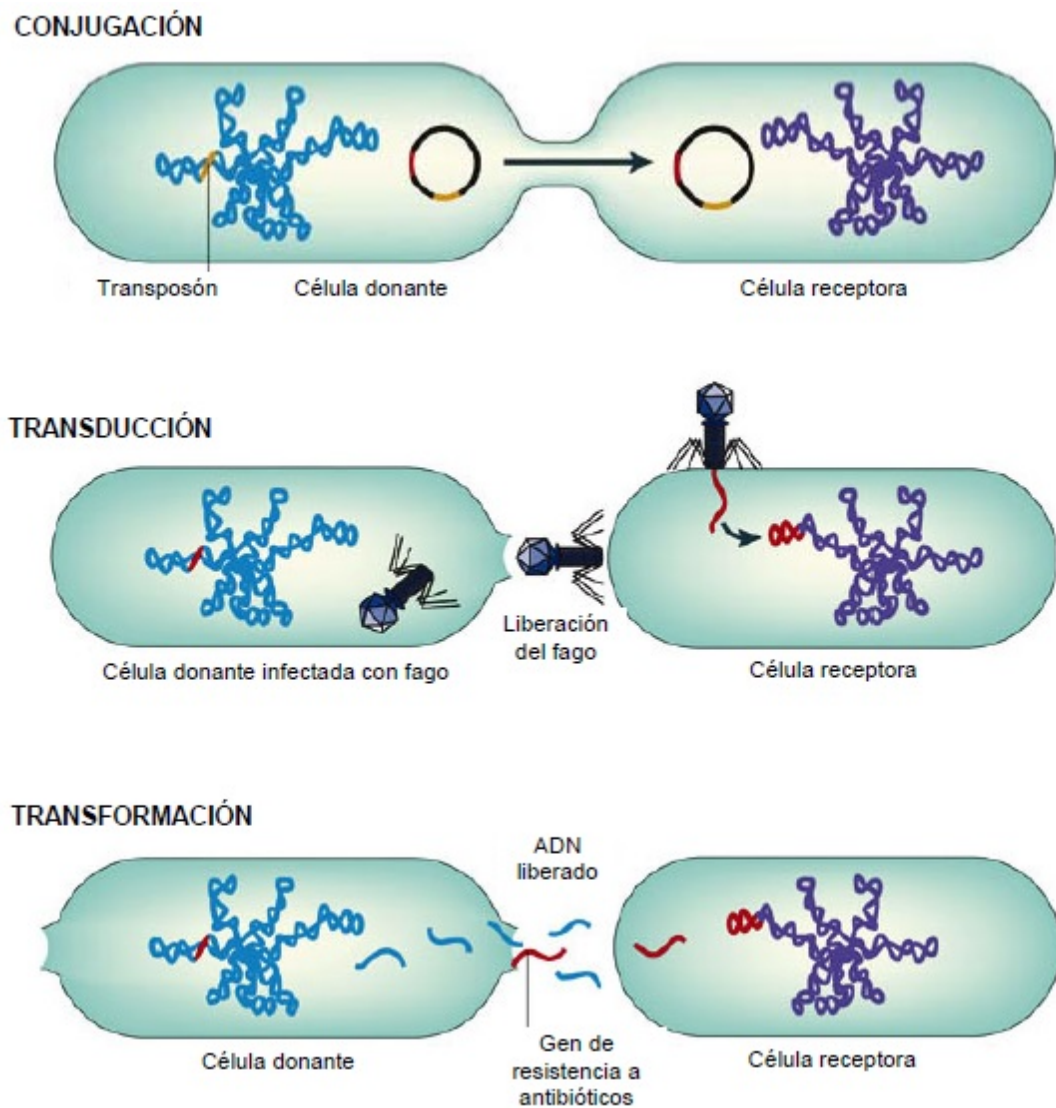


Figura 25. Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias (adaptado de Furuya & Lowy, 2006).

La diseminación de la resistencia a los antimicrobianos se ha atribuido en gran parte al intercambio inter e intra específico de ADN, siendo la transferencia horizontal de genes de resistencia, situados en plásmidos, el mecanismo prevalente en el origen de la adquisición de la resistencia en los patógenos bacterianos que causan infecciones nosocomiales o comunitarias. Se estima que la mayor parte de la resistencia adquirida está mediada por plásmidos (Alanis, 2005).

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico capaces de replicarse de forma autónoma y que pueden conferir resistencia a las principales clases de agentes antimicrobianos, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, macrólidos y quinolonas (Carattoli, 2009). Los plásmidos adquieren elementos genéticos móviles (secuencias de inserción, transposones) que movilizan los genes de resistencia a los antimicrobianos, promoviendo la transferencia horizontal de determinantes de resistencia entre las bacterias, incluso de diferentes especies y géneros, dependiendo de su rango (estrecho o amplio) de hospedadores, propiedades de la conjugación y eficiencia de la conjugación (Thomas & Nielsen, 2005).

La transferencia horizontal de genes en el Sistema Alimentario supone un peligro para el consumidor. La presencia de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos en los alimentos, capaces de provocar infección por ingestión o contacto, se considera un peligro directo (EFSA, 2008). Por otro lado, existe el peligro indirecto derivado de la transferencia horizontal de genes que codifican resistencia a antibióticos desde una bacteria no patógena hasta otra patógena, transferencia que puede ocurrir en cualquier punto a lo largo de la cadena alimentaria (Lester *et al.*, 2006).

El aumento de la prevalencia de resistencia a antibióticos es un proceso que se ve afectado por múltiples factores. Así, el incremento del uso de antibióticos en el ámbito mundial es la principal razón de esta propagación. Los hogares, escuelas, guarderías, hospitales y residencias de ancianos son lugares que se han identificado como un reservorio importante y un medio de transmisión de bacterias resistentes a antibióticos. Por otro lado, el uso de antimicrobianos en el pienso de animales productores de alimentos es otro factor que influye en la propagación debido a que los productos de origen animal entran en la cadena alimentaria humana, transmitiéndose así las resistencias desde los animales hasta la población humana. 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 los de empleo 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). Además, las personas que trabajan en la Industria Alimentaria (manipuladores) pueden contaminar los alimentos que después se van a consumir. Por lo tanto, el resultado final es que los propios alimentos actúen como reservorio y fuente de transmisión de resistencias.

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 (p. ej. *Salmonella*) e incluso patógenos estrictamente humanos (p. ej. *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 & Stobberingh, 2000). En la Figura 26 se esquematiza el ciclo de diseminación de bacterias resistentes a antibióticos, en el cual contribuyen, fundamentalmente, animales, seres humanos, alimentos y contaminación de aguas residuales.

La presión selectiva y la diseminación clonal son factores clave en la adquisición de un elemento extraño de resistencia, teniendo diferente influencia en función de la localización geográfica y del propio microorganismo. La presión selectiva ejercida por los antibióticos se refiere al impacto del uso de antimicrobianos sobre una población de microorganismos, en la cual, los organismos que son resistentes a un compuesto adquieren una ventaja de supervivencia sobre aquellos que son susceptibles al mismo, pero no solo por la presión selectiva, sino también porque la eliminación de la microbiota comensal susceptible a los antibióticos crea un nicho en el que los patógenos resistentes pueden propagarse con mayor facilidad.

La diseminación clonal se refiere a la propagación de clones específicos de un organismo a través de una comunidad. Estos clones tienen mayor capacidad para transmitirse que otros clones, por razones desconocidas. Las cepas que portan genes de resistencia a los antibióticos pueden ser más propensas a diseminarse clonalmente bajo condiciones de presión selectiva de antibióticos (Furuya & Lowy, 2006; Kirbis & Krizman, 2015).

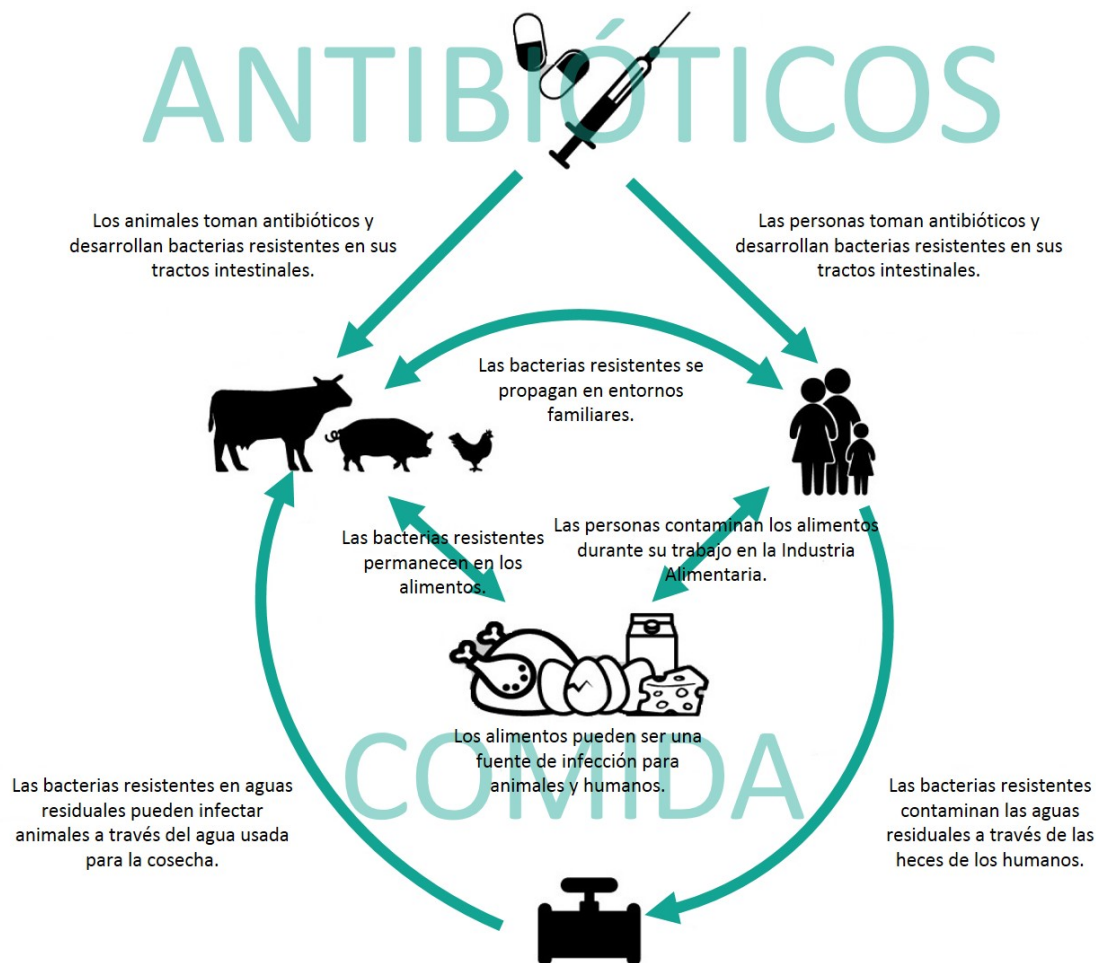


Figura 26. Diseminación de resistencia a antibióticos en bacterias a través de seres humanos, poblaciones animales, alimentos y aguas residuales (adaptado de Kirbis & Krizman, 2015).

3.4. Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea

3.4.1. Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en cepas procedentes de seres humanos

Los diferentes sistemas de vigilancia epidemiológica ponen de manifiesto el aumento de la prevalencia de resistencia a antibióticos a un ritmo muy acusado en los últimos años. En la Unión Europea existe actualmente una elevada prevalencia de resistencia a antibióticos de importancia clínica en algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, habiendo sido necesarios únicamente cuatro años para que la tendencia de resistencia a este antibiótico aumente en España (Figura 27).

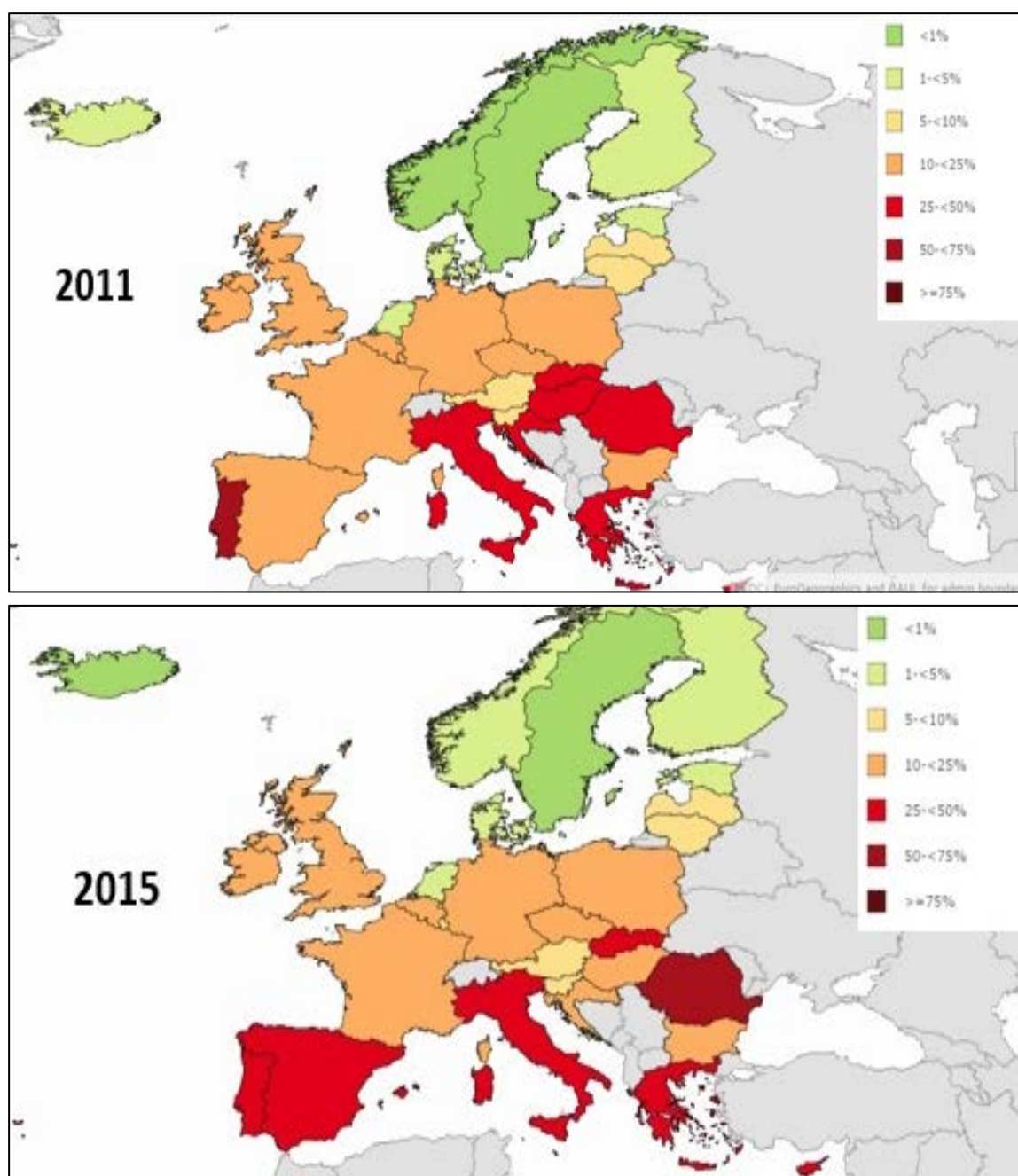
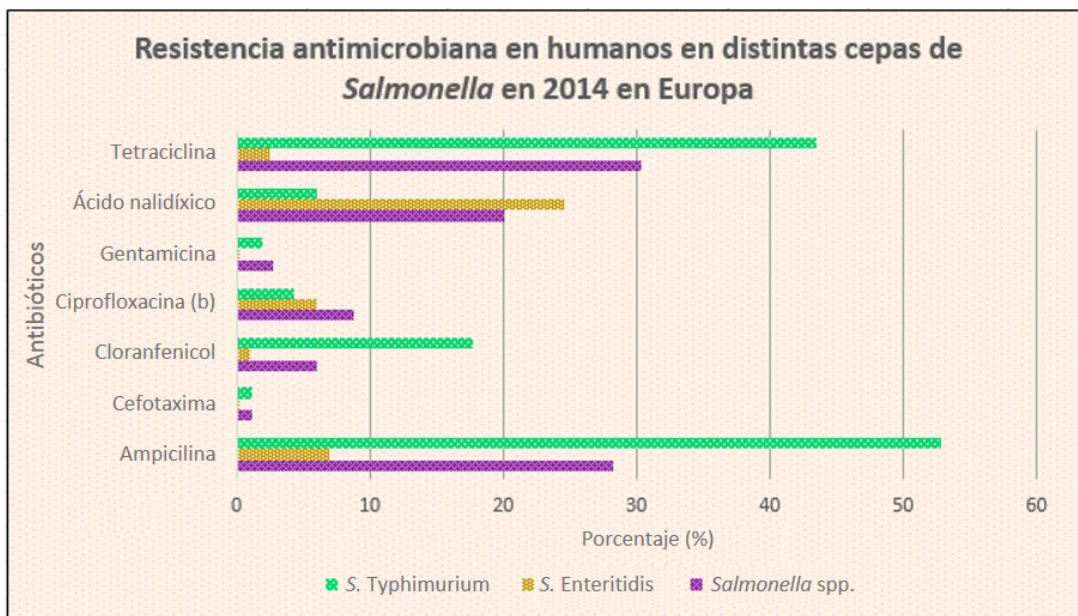


Figura 27. Proporción de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a la meticilina en 2011 (gráfica superior) y 2015 (gráfica inferior) en la Unión Europea (ECDC, 2016).

En la Figura 28 se observa el porcentaje de resistencias a antibióticos de importancia clínica en cepas de *Salmonella* en la Unión Europea en 2014, encontrándose los porcentajes más elevados de resistencia en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, siendo la ampicilina (52,8%) el antibiótico frente al cual se

encontró el mayor porcentaje de resistencias, seguido de las tetraciclinas (43,5%). El antibiótico frente al que *Salmonella* mostró el menor porcentaje de cepas resistentes fue la cefotaxima (1,2%).

El hecho de que *S. Typhimurium* fue el serotipo que presentó un mayor porcentaje de resistencias a antibióticos implica que las cepas de este serotipo suponen un peligro importante para la Salud Pública, de ahí una de las razones de su elección en este Trabajo de Tesis Doctoral.



(b), En varios países, la ciprofloxacina ha sido reemplazada por pefloxacina para el cribado de la resistencia a la fluoroquinolona por la técnica de difusión por disco, como recomienda EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Figura 28. Proporción de cepas de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* spp. de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a tetraciclina, ácido nalidíxico, gentamicina, ciprofloxacina, cloranfenicol, cefotaxima y ampicilina en 2014 en la Unión Europea (datos de EFSA, 2016).

3.4.2. Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en cepas procedentes de carne de ave

Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en carne de ave en cepas de MRSA

Respecto a la resistencia a antibióticos en MRSA, en la Figura 29 se observan los datos obtenidos en dos Estados Europeos (uno de la UE); de Suiza se obtuvieron los

datos para la carne fresca, mientras que de Bélgica se obtuvieron los datos de los rebaños reproductores y las gallinas ponedoras, encontrándose resistencias frente a todos los antibióticos utilizados en gallinas ponedoras (12 antibióticos). El número de antibióticos al que fueron resistentes las cepas aisladas de la carne fresca y de los rebaños reproductores fue de siete y cuatro antibióticos, respectivamente.

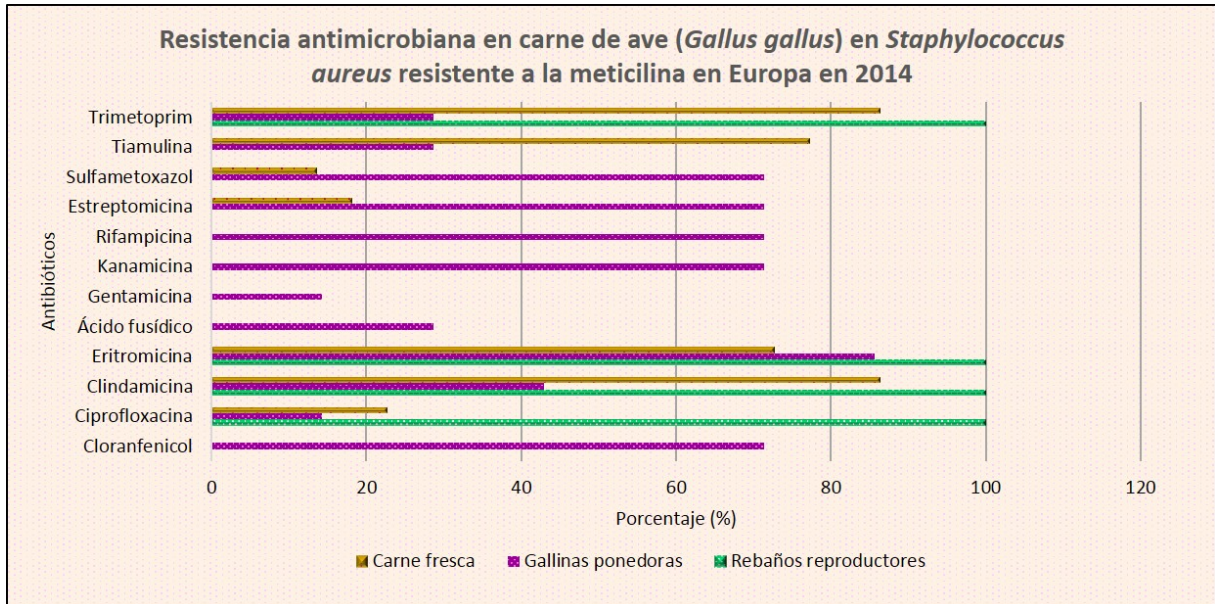
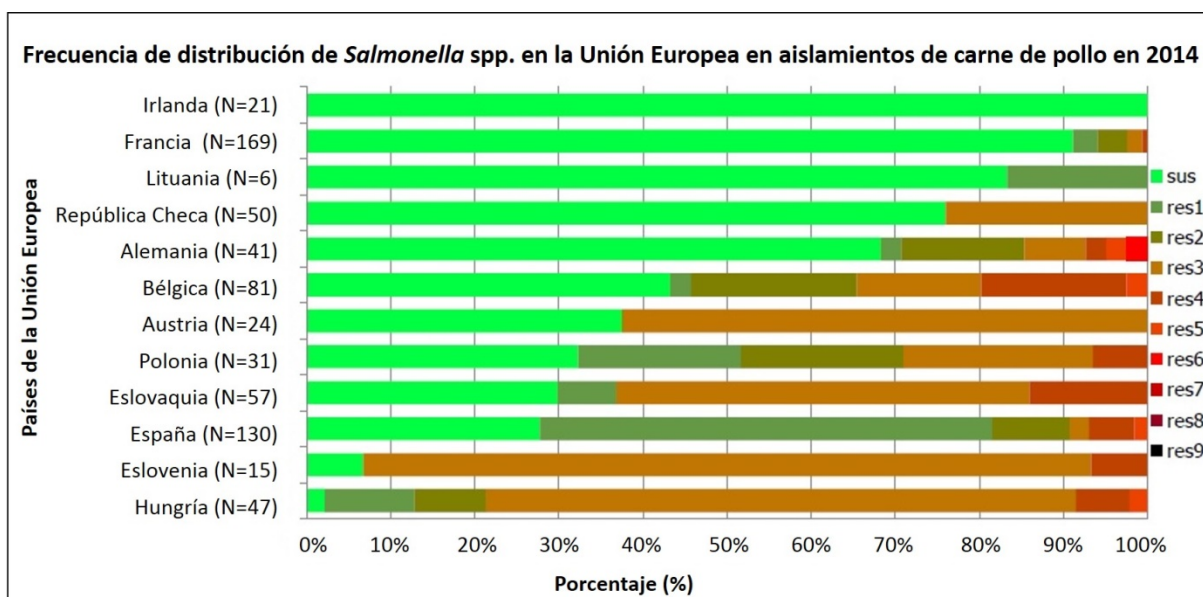


Figura 29. Porcentaje de resistencia a antimicrobianos seleccionados en cepas de MRSA procedentes de alimentos y animales en 2014 (datos de EFSA, 2016).

Los porcentajes más elevados de resistencias en rebaños reproductores se obtuvieron para ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina y trimetoprim, siendo los valores del 100%, seguidos en carne fresca de trimetoprim (86,4%) y eritromicina (85,7%). El menor porcentaje de resistencias en gallinas ponedoras se encontró para gentamicina y ciprofoxacina, con un valor del 14,3% en cada caso.

Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en carne de ave en cepas de *Salmonella*

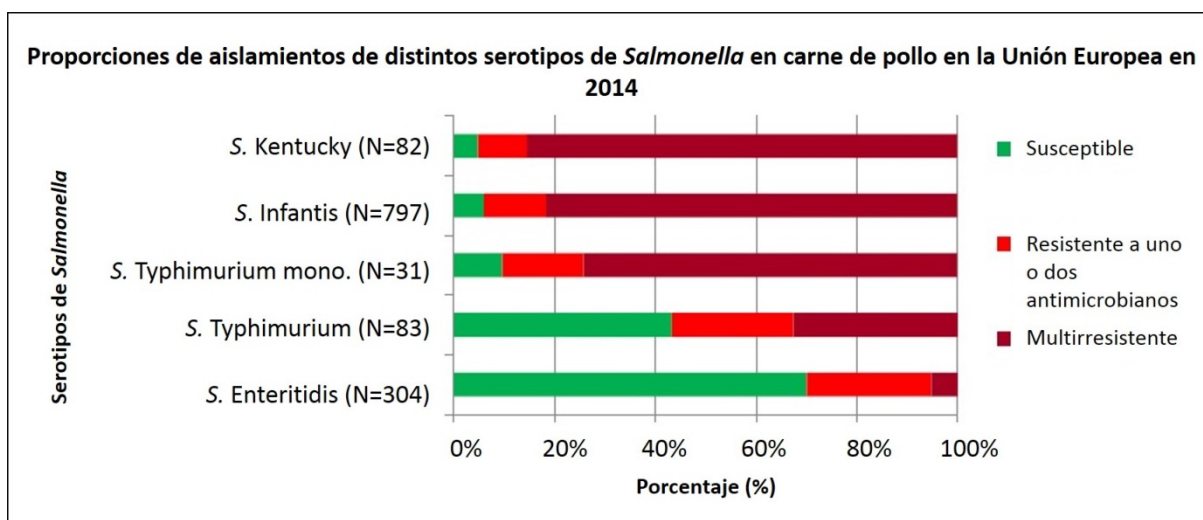
En cuanto a la resistencia a antibióticos de *Salmonella* en carne de pollo (*broiler meat*) en la Unión Europea en 2014, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 30, siendo España el tercer país en el que se obtuvo un mayor porcentaje de cepas resistentes.



N, número total de aislamientos sometidos a pruebas de susceptibilidad frente al conjunto de antimicrobianos usados para *Salmonella*; Sus, susceptible a todas las clases de antimicrobianos ensayados; Res1-res9: resistencia a una clase de antimicrobianos / resistencia a nueve clases antimicrobianos ensayados.

Figura 30. Frecuencia de distribución de aislamientos completamente susceptibles y resistentes desde uno a nueve de las clases de antimicrobianos usados en el *test* en diferentes países de la Unión Europea en 2014 (adaptado de EFSA, 2016).

Además, si se analizan las resistencias a antibióticos en función de diferentes serotipos de *Salmonella* en la Unión Europea en 2014 (Figura 31), en todos ellos se obtuvieron cepas multirresistentes, lo cual supone un riesgo importante para la Salud Pública. En concreto, en tres de los cinco serotipos analizados (*S. Kentucky*, *S. Infantis* y variante monofásica de *S. Typhimurium*), el porcentaje de cepas multirresistentes es muy elevado, de aproximadamente un 80%, un hecho preocupante, ya que, en caso de producirse, las infecciones provocadas por estas cepas serían muy difíciles de tratar.



N, número total de aislamientos sometidos a pruebas de susceptibilidad frente al conjunto de antimicrobianos usados para *Salmonella*.

Figura 31. Proporciones de aislamientos completamente susceptibles, resistentes a una o dos clases de antimicrobianos, y multirresistentes en los serovares de *Salmonella* aislados más comunes en la Unión Europea, 2014 (adaptado de EFSA, 2016).

3.4.3. Resistencia a antibióticos en Europa y en la Unión Europea en cepas procedentes de animales productores de alimentos

Distribución de MRSA en animales productores de alimentos

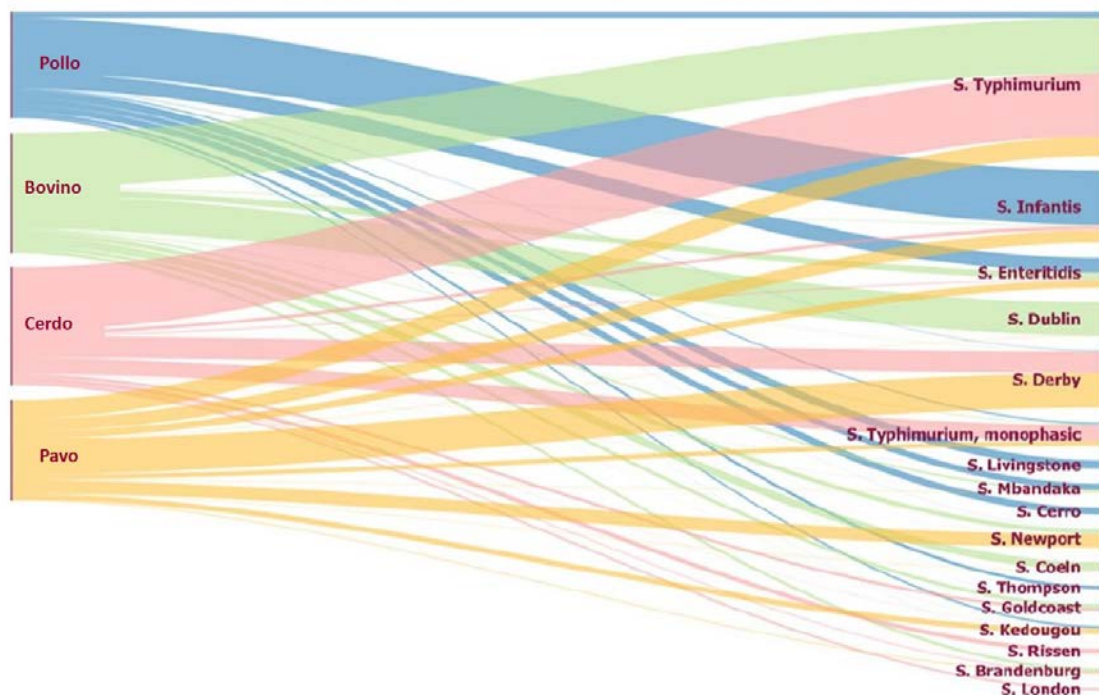
Por lo que hace referencia al año 2014, únicamente siete países europeos (Bélgica, Alemania, los Países Bajos, Islandia, Noruega, Suecia y Suiza) aportaron datos sobre la prevalencia de MRSA en animales productores de alimentos y / o en su medio ambiente.

En cuanto a los datos obtenidos excluyendo investigaciones clínicas, la mayor prevalencia de MRSA se encontró en cerdos (60%), seguidos de pavos (21,9%) y de ganado bovino (16,9% en vacas lecheras y 9,7% en leche de tanques). La menor prevalencia se obtuvo en pollos (*Gallus gallus*; 3%).

En el caso de estudios procedentes de investigaciones clínicas, se obtuvieron prevalencias muy elevadas de MRSA en granjas, siendo los valores del 100% para animales bovinos, ovejas y faisanes. En pavo (80%), *Gallus gallus* (70,9%) y cerdo (45,7%) se obtuvieron prevalencias también elevadas. La menor prevalencia se obtuvo en conejos (17,6%) (EFSA, 2016).

Distribución de *Salmonella* en animales productores de alimentos

En la actualidad, los principales serovares de *Salmonella* presentes en animales productores de alimentos y en los propios alimentos se encuentran distribuidos según el diagrama de Sankey (Figura 33). Entre los serotipos aislados, el más común es *S. Typhimurium* (23,4%), seguido por *S. Infantis* (23,3%), *S. Enteritidis* (7,8%), *S. Dublin* (5,9%) y *S. Derby* (5,3%). *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis* y *S. Derby* se aislaron de todas las matrices alimentarias consideradas, mientras que *S. Dublin* se aisló a partir de seis de las ocho matrices, aunque la gran mayoría de aislamientos procedían de bovino (98,3%) (EFSA, 2016).



El lado izquierdo del diagrama muestra las fuentes consideradas: pollo (azul), bovino (verde), cerdo (rosa) y pavo (amarillo). Los datos de animales y alimentos han sido mezclados (pollo incluye aislados de pollo y carne de pollo; el término bovino incluye datos de ganado bovino y carne bovina; cerdo incluye datos de cerdos y carne de cerdos; pavo incluye datos de pavos y carne de pavo). En el lado de la derecha, se observan los 17 serotipos de *Salmonella* más declarados de cada matriz. Los serovares incluidos son el resultado de un procedimiento de fusión que involucra los 7 serotipos más detectados para cada fuente. El ancho de cada banda coloreada es proporcional al porcentaje de aislamientos de cada serovar por fuente.

Figura 32. Diagrama de Sankey de los 17 serovares de *Salmonella* más notificados, en especies animales y alimentos de origen animal, por fuente, UE, 2015 (adaptado de EFSA, 2016).

Un dato destacable es que *S. Typhimurium* se encontró en todas las matrices alimentarias, siendo mayor su presencia en cerdo. *S. Infantis* se asoció principalmente con aves de corral (pollo y pavo), al igual que *S. Enteritidis*, si bien este último serovar también se asoció con el ganado vacuno. *S. Dublin* se asoció exclusivamente con ganado vacuno, mientras que *S. Livingstone* y *S. Cerro* se asociaron con carne de pollo. *S. Derby* también se relacionó, principalmente, con pavo y cerdo, al igual que la variante monofásica de *S. Typhimurium*.

4. BIOPELÍCULAS MICROBIANAS O *BIOFILMS*

Las biopelículas microbianas o *biofilms* son la forma de crecimiento bacteriano más frecuente en la naturaleza. Inicialmente estas estructuras fueron definidas por Costerton *et al.* (1987) como comunidades de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersas en un medio líquido. Posteriormente, estos mismos autores definieron los *biofilms* como bacterias o comunidades bacterianas unidas o fijadas a una superficie en un medio ambiente acuático, embebidas en una matriz o glicocálix. Pero fue más tarde cuando se hizo una definición que engloba las propiedades de los *biofilms*: «una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes» (Donlan & Costerton, 2002). Podemos encontrar bacterias que crecen en la superficie de medios de cultivo con esta estructura pero que, en cambio, no muestran algunas de las propiedades típicas de los *biofilms*; del mismo modo, podemos encontrar «fragmentos» procedentes de un *biofilm* que no se encuentran unidos a una superficie, pero que mantienen todas las características propias de las biopelículas (Mah & O'Toole, 2001). De todas las bacterias que forman parte de los *biofilms*, se estima que únicamente el 1% se encuentra en estado planctónico, suspendidas en el fluido, mientras que el 99% son bacterias sésiles o formadoras de *biofilms*, que crecen en colonias adhiriéndose a las superficies sólidas (Sanclément *et al.*, 2005).

La existencia de *biofilms* se conoce desde hace años. En la década de 1980 ya se observaban bacterias adheridas a superficies sólidas, como por ejemplo en zonas de tratamiento de aguas residuales, en el equipamiento usado en la obtención del vinagre

(Zottola & Sasahara, 1994), en el ambiente marino (Costerton *et al.*, 1978) o en las caries dentales (Rosen *et al.*, 1981).

En los últimos años ha aumentado el interés por estas estructuras y se han realizado numerosos estudios sobre la capacidad de los microorganismos para formar *biofilms* en diferentes superficies en diversas condiciones (temperaturas, agentes químicos...), tanto en el entorno clínico como alimentario.

El estudio de los *biofilms* ha sido posible gracias al avance en técnicas de microscopía. La microscopía láser confocal de barrido (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) es una técnica óptica utilizada para obtener imágenes de alta resolución de los *biofilms* y su posterior reconstrucción tridimensional. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para mejorar la comprensión de la arquitectura y funcionalidad de los *biofilms*, ya que es una herramienta que permite el estudio de la matriz del *biofilm* gracias a la observación a tiempo real de las estructuras vivas, completamente hidratadas. Aunque en los comienzos del uso de esta metodología los resultados obtenidos eran únicamente cualitativos (Ross *et al.*, 2014; Schlafer & Meyer, 2016) el avance de la técnica permite actualmente obtener datos cuantitativos de diversos parámetros del *biofilm* como biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima o rugosidad (Mosquera-Fernández *et al.*, 2016). Además, el uso de determinados colorantes que emiten fluorescencia permite cuantificar la cantidad de células vivas y muertas de la muestra, estimando así su viabilidad (Schlafer & Meyer, 2016). En términos generales, la microscopía láser confocal de barrido permite analizar la dinámica de las poblaciones microbianas, sus heterogeneidades fisiológicas y sus interacciones locales con flora competitiva o agentes antimicrobianos. Estas especificidades hacen que el empleo del CLSM sea particularmente adecuado para el análisis de la dinámica de patógenos en toda la cadena alimentaria y como una herramienta esencial para el desarrollo de nuevas estrategias de control, así como también para determinar el efecto de diferentes biocidas sobre los *biofilms* bacterianos (Ibusquiza *et al.*, 2012; Canette & Briandet, 2014).

4.1. Propiedades de los *biofilms*

4.1.1. Heterogeneidad fisiológica

Los *biofilms* están compuestos por gran cantidad de microorganismos, de la misma o de distinta especie, que compiten entre ellos por los nutrientes y el oxígeno (Nivens *et al.*, 1995).

La mayoría de microorganismos presentes en *biofilms* son aerobios, pero también existen microorganismos anaerobios, lo cual puede ser debido a que, aunque el oxígeno se distribuye a través de los canales (los *biofilms* tienen una estructura porosa con canales capilares por los que se distribuyen el agua, los nutrientes y el oxígeno; Costerton *et al.*, 1995), en la zona interior del *biofilm* es más difícil su difusión y por esta razón existe una baja concentración del gas (Genigeorgis, 1995).

4.1.2. Fenotipo del *biofilm*

Cuando la bacteria crece en *biofilms* de forma sésil, manifiesta un conjunto de caracteres visibles que se presentan como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio. En el *biofilm* existen una serie de características (nutrientes, pH, oxígeno, etc.) que interactúan con los microorganismos. Debido a estas interacciones, el fenotipo que se manifiesta es diferente respecto del que tenían cuando se encontraban de forma planctónica. Los fenotipos presentes en los *biofilms* se caracterizan por tener una mayor resistencia frente a diversos antibióticos, la cual mantienen incluso cuando se desprenden del *biofilm* (Köhler *et al.*, 2001; Socransky & Haffajee, 2002).

4.1.3. Comunicación célula-célula durante el proceso de formación del *biofilm*

El mecanismo *quorum sensing* ocurre mediante señales químicas que regulan la expresión de determinados genes a través de la acumulación de moléculas de señalización (Prosser, 1999). De este modo, los *biofilms* pueden adquirir propiedades que previamente no tenían, como promover la expresión de genes que aumentan la resistencia a antibióticos a partir de determinada densidad molecular (Cooper *et al.*, 1995).

4.1.4. Capacidad adaptativa

Los *biofilms* evolucionan de manera diferente en función de las características del medio que les rodea, manteniendo un equilibrio entre el crecimiento y el aporte de nutrientes.

4.1.5. Movimientos individuales y cooperativos de las bacterias

Cada bacteria posee unas características de motilidad, como la presencia de fimbrias, flagelos, *pili*, etc., que pueden usar para moverse de forma individual dentro del *biofilm*, pero debido a la capacidad de comunicación entre células, son capaces de desarrollar métodos para desplazarse de forma coordinada dentro del *biofilm*. Un ejemplo es el “*swarming*”, en el cual los microorganismos se desplazan en grupos de

células conectadas entre sí lateralmente conocidos como “rafts”. Este tipo de desplazamiento está asociado a la formación de *biofilms* y a ciertos mecanismos de resistencia a antibióticos (Harshey, 2003).

4.1.6. Intercambio génico

Como se ha indicado con anterioridad, las bacterias poseen la capacidad de transferir genes por medio de los procesos de conjugación, transformación, transferencia de plásmidos y de transposones. La tasa de transferencia génica mediada por plásmidos se ha visto enormemente incrementada entre las bacterias de los *biofilms* (Ghigo, 2001). Existen genes que están relacionados con la resistencia a antibióticos, lo cual implica que, si estos genes se transfieren entre los microorganismos del *biofilm* y se expresan, provocarán un aumento de la capacidad de resistencia a uno o varios antibióticos.

4.1.7. Ubicuidad

Pueden encontrarse *biofilms* en todos los medios en los que existan microorganismos, tanto en el medio natural como en los entornos clínico e industrial, ya que en presencia de nutrientes y de agua pueden desarrollarse con facilidad.

4.1.8. Propiedades físico-químicas

La carga superficial y la hidrofobicidad de las bacterias están implicadas en el proceso de adhesión de una bacteria a una superficie. La hidrofobicidad de la superficie de las bacterias varía entre especies e incluso entre cepas de la misma especie (Vatsos *et al.*, 2001). La carga neta de la superficie de la mayoría de las bacterias es negativa a pH neutro, pero depende de las condiciones de crecimiento y del propio microorganismo (Zottola & Sasahara, 1994). Esta carga neta negativa es adversa a la adhesión de las bacterias al sustrato debido a las fuerzas electrostáticas repulsivas, lo cual mantiene a las células a una distancia corta entre ellas, pero lejos del sustrato. Hay que reseñar que la superficie celular bacteriana posee hidrofobicidad debido a los flagelos, fimbrias y lipopolisacáridos. La hidrofobia está favorecida por una energía superficial baja, mientras que en la hidrofilia ocurre lo contrario. Se ha comprobado que la formación de *biofilms* es menos efectiva en superficies hidrofóbicas, como el polipropileno, que en superficies hidrofílicas, como el acero inoxidable (Kim *et al.*, 2016).

4.2. Formación de los *biofilms*

En la Figura 33 se observa la secuencia de acontecimientos que tienen lugar durante la formación de biopelículas en las superficies de contacto con alimentos. En primer lugar, las moléculas orgánicas de los alimentos se depositan en la superficie de los equipos y forman una película acondicionada. En segundo lugar, los microorganismos biológicamente activos son atraídos a las moléculas orgánicas. En tercer lugar, el microorganismo persistente permanece después de la limpieza y desinfección y se inicia el crecimiento. Por último, ocurre la expresión de genes celulares y la comunicación entre células (*quorum sensing*).

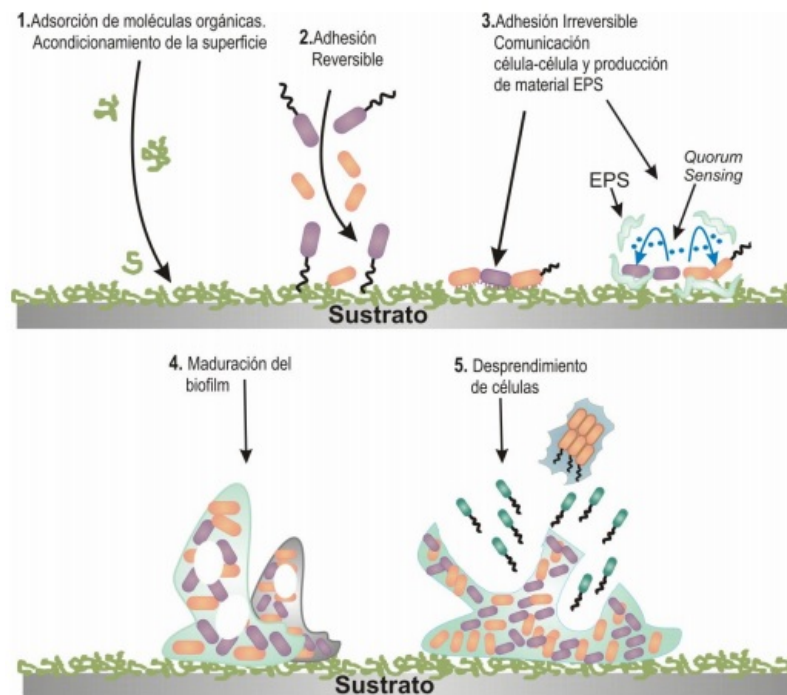


Figura 33. Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un *biofilm* sobre un sustrato (Díaz, 2011).

La formación de *biofilms* es, por lo tanto, un proceso dinámico que consta de cinco etapas, que se indican a continuación.

Etapas 1. Acondicionamiento de la superficie. Los *biofilms* se caracterizan por su ubicuidad, son capaces de crecer sobre cualquier superficie, siempre y cuando las condiciones sean las adecuadas. Existen estudios que demuestran que crecen sobre polipropileno, vidrio, acero inoxidable y superficies de caucho encontradas en ambientes de procesamiento de alimentos (Mafu *et al.*, 1990).

La formación de la película acondicionadora depende de factores físicos (carga superficial, rugosidad, topografía y temperatura) y de factores químicos (oxígeno disuelto, pH, composición del sustrato y del medio) (Characklis, 1981). Consiste en el recubrimiento de un sustrato sólido por una película de moléculas orgánicas presentes en el fluido (el cual contiene, además, minerales y microorganismos) y ocurre cuando dicha materia orgánica es adsorbida al entrar en contacto con la superficie. Estas células pioneras generan una capa basal de microcolonias de anclaje. Este paso facilita el siguiente, ya que, al acondicionarse al sustrato, éste adquiere unas propiedades físico-químicas modificadas que favorecen el desarrollo del *biofilm*.

Etapa 2. Adhesión celular. Tiene lugar en dos pasos:

2.1.1. Adhesión celular reversible. Consiste en una interacción débil entre los microorganismos y la superficie o sustrato. Esta interacción depende de las propiedades de ambos, junto con factores ambientales y la regulación genética de las bacterias (Shi & Zhu, 2009). Dentro de las propiedades de los microorganismos, es destacable que tanto los que tienen propiedades de movilidad (presencia de flagelos o fimbrias), como los que no, son capaces de realizar el proceso de adhesión celular. Por ello, este proceso puede ocurrir de forma activa o pasiva (Lillard, 1985; Kumar & Anand, 1998). En microorganismos que poseen fimbrias, como *Escherichia coli*, existen estudios que demuestran que la adhesión inicial ocurre gracias a ellas (Carter *et al.*, 2016). Durante esta etapa las células poseen una mayor susceptibilidad a los antibióticos que en etapas posteriores (Marshall, 1992). Las fuerzas hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de atracción de Van der Waals poseen largo alcance e interaccionan en el proceso de adhesión celular (Marshall *et al.*, 1971). Durante esta fase, estas fuerzas no son suficientes para mantener las células unidas, ya que los enlaces entre células y sustrato son débiles, por lo que es necesaria la propia participación de las bacterias y sus componentes extracelulares para que esta adhesión pase de reversible a permanente (Hancock, 1991).

2.1.2. Adhesión celular irreversible. Se caracteriza por la presencia de exopolisacáridos (EPS) en la superficie externa de las células. Los EPS juegan un papel importante en esta etapa, ya que actúan como adhesivos produciendo enlaces fuertes entre bacterias o entre las bacterias y el sustrato. Los EPS son polímeros biosintéticos que pueden variar en su composición química, y pueden incluir proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y polisacáridos (Stoodley *et al.*, 2002b).

En esta etapa participan, además de los EPS, flagelos, fimbrias y *pili* de las bacterias, que ayudan a evitar que las fuerzas repulsivas impidan su contacto con la superficie o el sustrato (Jones & Isaacson, 2008). Existen fuerzas de corto alcance como interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, iónicos, covalentes e hidrofóbicos que ayudan a la formación de un puente entre la superficie y el sustrato permitiendo la adhesión irreversible. En este momento del proceso, los *biofilms* son difíciles de eliminar, requieren el uso de detergentes, desinfectantes, surfactantes y/o altas temperaturas (Sinde & Carballo, 2000).

Etapa 3. Formación de microcolonias. Las células bacterianas adheridas irreversiblemente crecen y se dividen gracias a la utilización de los nutrientes presentes en el *biofilm* acondicionado y el medio ambiente fluido circundante. La formación de microcolonias es el resultado de la acumulación simultánea y el crecimiento de los microorganismos y se asocia con la producción adicional de EPS (Chmielewski & Frank, 2003), que ayuda a fortalecer el vínculo entre las bacterias y el sustrato y estabiliza a la colonia frente a cualquier estrés ambiental y las posibles fluctuaciones del entorno (Characklis & Marshall, 1990; Donlan, 2002). Estudios de diferentes especies bacterianas en los sistemas naturales han demostrado que la acumulación podría ayudar al reclutamiento de células planctónicas del medio circundante como resultado de la comunicación célula a célula (McLean *et al.*, 1997; Pesci *et al.*, 1999). Aunque las bacterias son autosuficientes, pueden “coordinar esfuerzos” con células vecinas. Esto ocurre en el desarrollo de los *biofilms* por un mecanismo de comunicación celular denominado *quorum sensing* (QS), que consiste en la capacidad para reconocer la densidad de la población mediante la producción de moléculas señal de bajo peso molecular. Este mecanismo se activa únicamente cuando la densidad de la población es muy alta (Solano *et al.*, 2014). Las microcolonias pueden ser muy beneficiosas, ya que proporcionan el intercambio del sustrato entre especies y/o la eliminación del producto final para las bacterias (Costerton *et al.*, 1994).

Etapa 4. Maduración. La maduración de las biopelículas es el paso mediante el cual estas se desarrollan en una estructura organizada que puede ser plana o en forma de seta, dependiendo de la fuente de nutrientes (Chmielewski & Frank, 2003; Klausen *et al.*, 2003). La formación de biopelículas es un proceso bastante lento, llegando a unos pocos milímetros de espesor en cuestión de días, dependiendo de las condiciones de cultivo. Para alcanzar la madurez se requieren periodos de 10 o más días (Sauer *et al.*, 2002). Las bacterias crecen bajo formas sésiles en complejos heterogéneos, dispersos y

con canales abiertos de agua (Davey & O'Toole, 2000). Los microorganismos dentro de la biopelícula no se distribuyen de manera uniforme. Crecen intercalados dentro de los canales de agua altamente permeables (Costerton *et al.*, 1994), no existiendo, necesariamente, una capa uniforme en toda la superficie de sustrato. Además, el aumento en el tamaño de la biopelícula se lleva a cabo por la deposición o fijación de otros solutos orgánicos e inorgánicos y partículas a la biopelícula de la fase líquida circundante (Melo *et al.*, 1992). Es en esta etapa de formación del *biofilm* cuando los microorganismos presentan una mayor resistencia a los antibióticos (Webb *et al.*, 2003).

Etapa 5. Dispersión. La dispersión es el último paso en el proceso de formación de *biofilms* y permite que las células vuelvan a su forma planctónica (Sauer *et al.*, 2002). Con el paso del tiempo, el *biofilm* aumenta su tamaño, por lo que las bacterias adheridas pueden no tener acceso a los nutrientes. Además, existe la posibilidad de que con el paso del tiempo se produzca acumulación de productos tóxicos de desecho que provoquen que el ambiente no sea favorable. Por ello, las bacterias adheridas deben ser capaces de separarse y dispersarse, con el fin de sobrevivir y colonizar nuevos nichos. Las células se separan individualmente o en forma de partículas relativamente grandes de biomasa del *biofilm* (Stoodley *et al.* 1999; Stoodley *et al.* 2001; Choi & Morgenroth, 2003).

Algunas de las posibles causas de la dispersión de *biofilms* pueden ser externas, como el aumento de fuerza de cizallamiento del fluido (Stoodley *et al.*, 2002a), o la presencia de ciertas sustancias químicas en el medio fluido o propiedades de superficie, de la bacteria o del sustrato, alteradas. Las bacterias liberadas pueden ser transportadas a otros lugares y reiniciarse de nuevo el proceso de formación del *biofilm* (Marshall, 1992), o bien producirse procesos internos como la degradación enzimática endógena o la liberación de EPS (Kaplan *et al.*, 2003). La dispersión es un proceso activo que permite la colonización de nuevos nichos (Sauer *et al.*, 2002). Además, la falta de nutrientes también se considera como una razón de la separación y permite que las bacterias puedan buscar un ambiente rico en nutrientes (O'Toole *et al.*, 2000).

4.3. *Biofilms* en la Industria Alimentaria

La formación de *biofilms* en la Industria Alimentaria está condicionada por los factores que se indican en la Figura 34. Existe una compleja interacción de factores (medio ambiente, célula, industria y propiedades de las superficies) que da como resultado la formación del *biofilm*, su arquitectura (complejo diseño de la estructura del

biofilm) y, por lo tanto, su funcionalidad (modo de actuación del *biofilm*) que en última instancia están relacionadas con el entorno industrial en el que se encuentra el alimento (Whitehead & Verran, 2015).



Figura 34. Interacción de factores que influyen en la formación de *biofilms*, arquitectura y funcionalidad en la Industria Alimentaria (adaptado de Whitehead & Verran, 2015).

4.3.1. Aspectos negativos de los *biofilms*

Se sabe desde hace años que la unión de las bacterias a las superficies de contacto con alimentos conlleva la contaminación de los mismos y conduce a graves problemas, tanto desde el punto de vista sanitario como económico, por las pérdidas debidas al deterioro de los alimentos (Carpentier & Cerf, 1993). Por otro lado, existen estudios en los que se ha demostrado la persistencia de varios agentes patógenos, como *Listeria monocytogenes* (Allen *et al.*, 2015), *Campylobacter jejuni* (Han *et al.*,

2016), *Escherichia coli* O157:H7 (Zhang *et al.*, 2016) y *Salmonella* spp. (Yang *et al.*, 2016), en las superficies de las industrias de alimentos.

La presencia de *biofilms* en las instalaciones y equipos de las industrias de procesado de alimentos es indeseable, ya que estas estructuras tienen el potencial de actuar como una fuente persistente de contaminación microbiana que puede conducir a la alteración de los alimentos y a la transmisión de enfermedades. Además, las células asociadas a los *biofilms* suelen presentar una elevada resistencia a los antimicrobianos, incluyendo antibióticos y biocidas, por lo que estas células son más resistentes a los procesos de limpieza y desinfección (L+D) que se usan habitualmente en la Industria Alimentaria (Costerton *et al.*, 1987; De Beer *et al.*, 1994; Suci *et al.*, 1994; Ryu & Beuchat, 2005; Scher *et al.*, 2005; Uhlich *et al.*, 2006).

La unión de las bacterias a distintas superficies inertes de contacto con alimentos ha sido objeto de un primer informe publicado por Zoltai *et al.* (1981). Posteriormente, se han continuado los estudios de microorganismos formadores de *biofilms* en la Industria Alimentaria, encontrándose tanto en superficies inertes como en los propios alimentos (Tabla 7).

Entre los microorganismos formadores de *biofilms* se encuentran algunos de los principales responsables de infecciones e intoxicaciones alimentarias humanas, como *Salmonella*, que sigue siendo el agente causal más frecuentemente implicado en brotes de origen alimentario, como ha sido expuesto en apartados previos de esta Memoria. De 2008 a 2013, el número total anual de brotes por *Salmonella* en la UE disminuyó notablemente, pasando de 1.888 a 1.168 brotes en el periodo señalado. *Salmonella* se detectó con mayor frecuencia en la carne de ave, y con menos frecuencia en el cerdo o la carne bovina. *Salmonella* es el agente etiológico de la segunda zoonosis más frecuente (después de *Campylobacter*) en todo el mundo, y más del 95% de los casos de enfermedad causados por estas bacterias son transmitidas por los alimentos (EFSA-ECDC, 2015).

Tabla 7. Microorganismos formadores de *biofilms* en la Industria Alimentaria.

Tipo de industria	Microorganismo	Lugar en el que se ha encontrado	Referencia
Productos lácteos	<i>Listeria monocytogenes</i>	Acero inoxidable, caucho, goma de nitrilo	Helke <i>et al.</i> (1993)
	<i>Streptococcus</i> <i>Bacillus</i>	Leche pasteurizada	Flint <i>et al.</i> (1997)
	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Líneas de pasteurización	Sharma & Anand (2002)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche cruda	Weiler <i>et al.</i> (2013)
	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Cronobacter</i> <i>Salmonella</i> Typhimurium	Acero inoxidable, superficies de polipropileno	Bayoumi <i>et al.</i> (2012)
	<i>Salmonella</i> Tenesse	Mantequilla de cacahuete	Aviles <i>et al.</i> (2013)
	Pescado	<i>Vibrio harveyi</i>	Superficies de cemento, plástico y aluminio
<i>Neisseriaceae</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Vibrio</i> <i>Listeria</i>		Unidad de procesamiento del caviar	Bagge-Ravn <i>et al.</i> (2003)
<i>Vibrio</i>		Sistema de distribución de agua marina	Shikongo - Nambabi <i>et al.</i> (2010)
Helados	<i>Listeria monocytogenes</i>	Línea de producción	Gunduz & Tunzel (2006)
Carne	<i>Staphylococcus equorum</i>	Salchichas secas	Leroy <i>et al.</i> (2009)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Cadena producción carne de cerdo	O'Leary <i>et al.</i> (2013)
	<i>Listeria monocytogenes</i>		Ortiz <i>et al.</i> (2014)
Carne de ave	<i>Salmonella</i> Weltevreden	Plástico, cemento, acero inoxidable	Joseph <i>et al.</i> (2001)
	<i>Salmonella</i>	Piel de pollo, carne pollo	Wang <i>et al.</i> (2013)
Lechuga	<i>Salmonella</i>	Lechuga romana e iceberg	Patel & Sharma (2010)
Espinaca y berro	<i>Salmonella</i> Thompson <i>E. coli</i> O157:H7	Hojas	Warner <i>et al.</i> (2008) Carter <i>et al.</i> (2016)
Tomate	<i>Salmonella</i> Montevideo	Piel	Iturriaga <i>et al.</i> (2007)
Melón	<i>Salmonella</i> spp.	Corteza	Annous <i>et al.</i> (2005)
Cilantro	<i>Salmonella</i> Thompson	Hojas	Brandl & Mandrell (2002)

Con respecto a las superficies de los alimentos, muchos estudios realizados por diferentes investigadores han demostrado la unión de los microorganismos a la superficie de carne de ave, cerdo, ternera o cordero (Notermans & Kampelmacher, 1974; Butler *et al.*, 1979; Thomas & McMeekin, 1980; Lillard, 1985; Scheler *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2016), así como a distintos alimentos listos para el consumo (Zhang *et al.*, 2016). La presencia de microorganismos en la superficie de la carne se asocia fundamentalmente con el proceso de sacrificio y con la contaminación cruzada que ocurre durante el faenado, favorecida por el alto ritmo de sacrificio de los mataderos modernos, donde la proximidad de los animales en la cadena de procesado favorece la transferencia de bacterias de unas canales a otras (Capita *et al.* 2007).

Existen estudios que demuestran que los distintos serotipos de *Salmonella* son capaces de formar *biofilms* tanto en la carne como en diferentes materiales presentes en la línea de producción (p. ej. acero inoxidable o plástico) (Díez-García *et al.*, 2012). También existen estudios sobre la presencia de *Staphylococcus* spp. en carne de ave (Teramoto *et al.*, 2016). Según recogen los informes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA), en 2013 hubo 12 Estados Miembros que informaron de 386 brotes de intoxicación estafilocócica (este valor representa el 7,4% de todos los brotes), cifra superior a la del año anterior, 2012, en el que 14 Estados Miembros notificaron 346 brotes causados por las toxinas de estafilococos. En 2013, la tasa global de esta intoxicación en la UE fue de 0,13 casos por 100.000 habitantes. Francia informó de la gran mayoría (87%) de los brotes, lo cual representa un incremento del 12% en comparación con 2012 (EFSA-ECDC, 2015).

Dentro de la especie *Staphylococcus aureus*, las cepas resistentes a la meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) representan el 44% de las infecciones nosocomiales (aproximadamente 171.000 cada año) en la Unión Europea, lo que conlleva unas 5.400 muertes estimadas atribuibles y unos elevados costes hospitalarios, calculados en unos 380 millones de euros anuales (Köck *et al.*, 2010). Además de las infecciones por MRSA adquiridas en el hospital, en los últimos años se han descrito infecciones severas por este microorganismo fuera del ámbito hospitalario. Los animales productores de alimentos y los alimentos de origen animal se consideran una posible fuente y una vía de transmisión de MRSA en la comunidad (Oniciuc *et al.*, 2015).

4.3.2. Aspectos positivos de los *biofilms*

Además de los aspectos negativos relacionados con la Seguridad Alimentaria o con la alteración de los alimentos, los *biofilms* tienen también implicaciones positivas en la Industria Agroalimentaria. Por ejemplo, en el cultivo de los camarones los *biofilms* se usan para la adecuada nutrición de los mismos, ya que poseen una elevada concentración de fósforo y nitrógeno respecto a otras fuentes de alimentación (Thompson *et al.*, 1999). Existen estudios que demuestran que el crecimiento y la supervivencia de estos animales es mayor en presencia de *biofilms* (Audelo-Naranjo *et al.*, 2011).

Los *biofilms* se utilizan también en procesos de fermentación para la producción de alcohol, enzimas, ácidos orgánicos, antibióticos, polímeros y cultivos iniciadores (*starter*) (Ercan & Demirci, 2015). Es de destacar su interés en el procedimiento de obtención de aceitunas verdes estilo español o sevillano; se utilizan durante la etapa de fermentación, formando parte del producto final (se forman en la parte cortical de la aceituna) y, por lo tanto, son ingeridos por el consumidor. Es necesario que exista el inóculo en los tanques de fermentación para que se formen los *biofilms* (Jiménez-Díaz, 2014).

Otro de los usos de los *biofilms* es la biorremediación, para eliminar la contaminación de determinados lugares, ya que las biopelículas actúan degradando el contaminante de forma natural y económica ayudando a la conservación de monumentos históricos, depuradoras, aguas, suelo y superficies (Echevarría-García, 2013).

4.4. *Biofilms* y resistencia a antibióticos

Es un hecho descrito en numerosas ocasiones que las bacterias presentes en los *biofilms* ven incrementada su resistencia a antibióticos respecto a las bacterias planctónicas. Existen diversas teorías que intentan explicar cómo y por qué el desarrollo de las bacterias en los *biofilms* aumenta su resistencia a los antibióticos:

1. El grosor del *biofilm* y la matriz de EPS o glicocálix dificulta o evita la entrada de los antibióticos a las células presentes en el *biofilm* (Stewart, 1996).
2. Existe un crecimiento lento de las células cuando hay limitación de nutrientes. La transición de crecimiento exponencial a lento o a ausencia de crecimiento conlleva generalmente un aumento de resistencia a antibióticos. Este aumento puede ser debido al cambio fisiológico provocado por el estrés (Tuomanen *et al.*, 1986).

3. El interior del *biofilm* es heterogéneo, por lo que dependiendo de la localización de cada célula dentro del *biofilm*, la respuesta a los antimicrobianos será diferente, siendo más resistentes las células de la parte interna (Mah & O'Toole, 2001).
4. Los propios antibióticos inducen el crecimiento de los *biofilms*. Si bien algunos estudios han demostrado que, aunque las concentraciones inferiores a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de antibióticos no son capaces de inactivar las bacterias, pueden inhibir la formación de *biofilms* (Wagner *et al.*, 2005), trabajos recientes han puesto de manifiesto que las concentraciones subinhibitorias estimulan la producción de *biofilm*, aunque este hecho varía entre cepas y antibióticos. La mayoría de estos estudios indican que los antibióticos inducen la formación máxima del *biofilm* a concentraciones inferiores o iguales a la CMI/2, pero algunos inducen la máxima formación a concentraciones superiores a la CMI/2 (Kaplan, 2011).
5. En los *biofilms* existe transferencia de genes de resistencia por medio de plásmidos conjugativos; este mecanismo de transferencia horizontal de genes de resistencia está enormemente incrementado respecto a las bacterias planctónicas. Así, el 30% de los genes de una bacteria puede expresarse de una manera diferente según su desarrollo sea planctónico o en forma de *biofilm*.
6. Algunos antibióticos inducen la expresión de genes que provocan un aumento de la resistencia a antibióticos, como se ha observado en *Escherichia coli* que, como respuesta al cloranfenicol, induce la expresión de bombas de expulsión inespecíficas, que confieren multiresistencia a diferentes compuestos (Moreira *et al.*, 2005).
7. Entre otras causas adicionales de la elevada resistencia a los antibióticos por las bacterias sésiles podemos encontrar: alteración de la permeabilidad de la membrana vía disminución de la síntesis de porina, inducción de operones resistentes a antimicrobianos, bombas de expulsión, sobreproducción de enzimas que degradan componentes antimicrobianos y quiescencia (IFT, 2006).

4.5. Estrategias de control de los *biofilms*

Desde que los *biofilms* han adquirido el papel protagonista que hoy tienen en el sector alimentario, se han realizado numerosos estudios para prevenir la formación de *biofilms* o eliminarlos una vez formados (Midelet & Carpentier, 2004; Simões *et al.*, 2006). Dentro de las estrategias de control convencional se utiliza la limpieza y desinfección, mediante el uso de productos químicos que reaccionan con la matriz del *biofilm* mejorando su posterior eliminación mediante procedimientos mecánicos. Se incluye aquí la frecuentemente empleada tecnología CIP (*cleaning-in-place*), un proceso que permite la limpieza de los equipos e instalaciones sin necesidad de desmontarlos y sin que el operador los manipule manualmente (Romney, 1990). La tasa de eliminación de los *biofilms* aumenta significativamente tras su tratamiento con productos químicos (Simoes *et al.*, 2005), entre los que se encuentran, por ejemplo, el hipoclorito sódico, el peróxido de hidrógeno, el ozono y el ácido peracético. Además de estos procedimientos convencionales de control, se han introducido nuevos métodos para controlar los *biofilms* en la Industria Alimentaria tales como ultrasonificación, enzimas, fagos y la combinación de dos o más técnicas, bajo la filosofía de la denominada teoría de barreras o de vallas (*hurdle technology*).

OBJETIVOS GENERALES DE ESTA TESIS DOCTORAL

1. Conocer la calidad microbiológica de diferentes preparados de carne de ave a nivel de establecimientos de venta al público del noroeste de España y determinar el perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de dichos alimentos.
2. Determinar los patrones de resistencia a antibióticos de cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) aisladas de preparados cárnicos y evaluar el sistema *Sensi Test Gram-positive* para determinar la resistencia a antibióticos de dichas cepas, comparando los resultados del método de difusión por disco y del *test* miniaturizado.
3. Investigar, por medio de microscopía láser confocal de barrido (CLSM), los efectos de concentraciones por debajo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de tres biocidas (cloruro de benzalconio, fosfato trisódico e hipoclorito sódico) en los parámetros estructurales (biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, rugosidad y altura máxima) de los *biofilms* producidos por una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) de origen alimentario. Adicionalmente, realizar un análisis cuantitativo de la viabilidad bacteriana en los *biofilms*.
4. Determinar si la exposición, y la consecuente adaptación, de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium a concentraciones subinhibitorias de tres biocidas (cloruro de benzalconio, fosfato trisódico e hipoclorito sódico), puede influir en la capacidad de la bacteria para formar *biofilms*. Con esta finalidad, se realizó un estudio cuantitativo, mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM), de los parámetros estructurales (biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad) y de la viabilidad de los *biofilms* formados por una cepa de *S. Typhimurium* (S175) de origen alimentario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AECOSAN -Agencia Española del Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición- (2015). Presencia de compuestos de amonio cuaternario en los alimentos. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/contenido_extra_9_amonios_cuaternarios.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* **36** (6), 697-705.
- Aldana, L., Sarassa, S. (1999). *Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a cepas de Listeria monocytogenes*. Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología Industrial, Bogotá, Colombia.
- Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2015). Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**, 86-94.
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology* **37** (2-3), 130-136.
- Allen, K. J., Walecka-Zacharska, E., Chen, J. C., Katarzyna, K.-P., Devlieghere, F., Meervenue, E. V., Osek, J., Wiczorek, K., Bania, J. (2015). *Listeria monocytogenes* - An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiology* **54**, 178-189.
- Ammor, M. S., Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science* **76**, 138-146.
- Andersen, E. V. M. (2016). Bacterial Resistance to Biocides, pp. 603-616. En: Lelieveld, H. L. M., Holah, J., Gabric, D. (eds.), *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam.
- Annous, B. A., Solomon, E. B., Cooke, P. H., Burke, A. (2005). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melons. *Journal of Food Safety* **25**, 276-287.
- Audelo-Naranjo, J. M., Martínez-Córdova, L. R., Voltolina, D., Gómez-Jiménez, S. (2011). Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates. *Aquaculture Research* **42** (9), 1371-1377.
- Aviles, B., Klotz, C., Eifert, J., Williams, R., Ponder, M. (2013). Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an *in vitro* digestion system. *International Journal of Food Microbiology* **162** (3), 252-259.
- Azanza, J. R., Sádaba B., Mediavilla, A., Flórez, J. (2003). Quinolonas. Sulfamidas. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína. Antisépticos, pp. 1169-1186. En: Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (eds.), *Farmacología Humana*, 4^a ed. Masson, Barcelona.

- Bagge-Ravn, D., Nga, Y., Hjelma, M., Christiansena, J. N., Johansen, C., Grama, G. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology* **87** (3), 239-250.
- Bayoumi, M. A., Kamal, R. M., Abd El Aal, S. F., Awad, E. I. (2012). Assessment of a regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *International Journal of Food Microbiology* **158** (3), 225-231.
- Betancor, L., Gadea, M. P., Flores, K. (2008). Genética bacteriana, pp. 65-90. En: *Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del Libro FEFMUR, Montevideo.
- Betelgeux (2017). Desinfectantes utilizados en la Industria Alimentaria: características, modo de actuación y aspectos que inciden en su eficacia. Disponible en: http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo_boletin_Desinfectantes_y_Modo_de_accion_en_IIAA.pdf. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Bank, E. D., Johnston, M. D., Barton, H. A., Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE* **7** (4), e34953.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature* **13**, 42-51.
- Blázquez, J., Couce, A., Rodríguez-Beltrán, J., Rodríguez-Rojas, A. (2012). Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Current Opinion in Microbiology* **15** (5), 561-569.
- BOE -Boletín Oficial del Estado- (2002). Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. [BOE núm. 247, de 15 de octubre de 2002, páginas 36188 a 35220 (33 págs). BOE-A-2002-19923]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2002/10/15/pdfs/A36188-36220.pdf>. Fecha del último acceso: 06 de enero de 2017.
- Bower, C. K., Daeschel, M. A. (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology* **50** (1), 33-44.
- Brandl, M. T., Mandrell, R. E. (2002). Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the Cilantro Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3614-3621.
- Braoudaki, M., Hilton, A. C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (1), 73-78.
- Butler, J. L., Stewart, J. C., Vanderzant, C., Carpenter, Z. L., Smith, G. C. (1979). Attachment of microorganisms to pork skin and surfaces of beef and lamb carcasses. *Journal of Food Protection* **5**, 401-406.
- Bywater, R. J. (2005). Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. *Poultry Science* **84**, 644-648.

- Calvo, J., Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **27** (1), 44–52.
- Canette, A., Briandet, R. (2014). Microscopy: Confocal Laser Scanning Microscopy, pp. 676-683. En: Batt, C. A., Tortorello, M. L. (eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd ed. Elsevier Ltd., Amsterdam.
- Capita González, R. (2013). *Papel de la Industria Alimentaria en el control de la resistencia bacteriana a los antibióticos*. Discurso de Toma de Posesión como Académica Correspondiente. Universidad de León, León.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53** (1), 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M. C., Moreno, B. (2002). Review: Trisodium phosphate (TSP) treatment for decontamination of poultry. *Food Science and Technology International* **8** (1), 11-24.
- 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.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53** (6), 2227-2238.
- Carpentier, B., Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* **75** (6), 499-511.
- Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W., Brandl, M. T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiology* **57**, 81-89.
- Casado-Muñoz, M. C., Benomar, N., Lavilla-Lerma, L., Knapp, C. W., Gálvez, A., Abriouel, H. (2016). Biocide tolerance, phenotypic and molecular response of lactic acid bacteria isolated from naturally-fermented Aloreña table to different physico-chemical stresses. *Food Microbiology* **60**, 1-12.
- Cattoir, V. (2004). Efflux mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathologie Biologie* **52**, 607-616.
- Cepero Briz, R. (2006). *Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias*. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- Ceragioli, M., Mols, M., Moezelaar, R., Ghelardi, E., Senesi, S., Abee, T. (2010). Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (10), 3352-3360.
- Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* **51** (4), 277-282.

- Cohen, N., Ennaji, H., Bouchrif, B., Hassar, M., Karib, H. (2007). Comparative study of microbiological quality of raw poultry meat at various seasons and for different slaughtering processes in Casablanca (Morocco). *The Journal of Applied Poultry Research* **16** (4), 502-508.
- Cooper, M., Batchelor, S. M., Prosser, J. I. (1995). Is cell density signalling applicable to biofilms?, pp. 93-97. En: Wimpenny, J., Handley, P., Gilbert, P., Lappin-Scott, H. (eds.), *The life and death of biofilm*. Bionline Press, Cardiff.
- Corry, J. E. L. (2009). Microorganismos alterantes en la carne roja y de ave, pp. 101-121. En: Mead, G. C. (ed.), *Análisis microbiológico de carne roja, aves y huevos*. Acribia, Zaragoza.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology* **41** (1), 435-464.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American* **238**, 86-95.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology* **49** (1), 711-745.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* **176** (8), 2137-2142.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38** (7), 1447-1451.
- Cubero, N., Monferrer, A., Villalta, J. (2002). *Aditivos alimentarios*, 1ª ed. Mundi Prensa, Madrid.
- Chamakura, K., Perez-Ballester, R., Luo, Z., Bashir, S., Liu, J. (2011). Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **84** (1), 88-96.
- Characklis, W. G. (1981). Bioengineering report: fouling biofilms development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **23** (9), 1923-1960.
- Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1990). *Biofilms*. John Wiley, New York.
- Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2** (1), 22-32.
- Choi, Y. C., Morgenroth, E. (2003). Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Science and Technology* **47** (5), 69-76.
- Daikos, G. L., Koutsolioutsou, A., Tsiodras, S., Theodoridou, M., Koutouzis, E. I., Charissiadou, A., Pangalis, A., Michos, A. G., Chaidopoulou, F., Braoudaki, M., 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.

- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **28** (3), 261-289.
- Davey, M. E., O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64** (4), 847-867.
- Davidson, P. M., Harrison, M. A. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology* **56** (11), 69-78.
- Davidson, P. M., Zivanovic, S. (2003). The use of natural antimicrobials, pp. 5-30. En: Zeuthen, P., Bogh-Sorensen, L. (eds.), *Food preservation techniques*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74** (3), 417-433.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477** (31), 457-461.
- De Beer, D., Srinivasan, R., Stewart, P. S. (1994). Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (12), 4339-4344.
- Del Rio, E., Panizo-Morán, M., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2006). Calidad microbiológica de carne de pollo en el momento de su obtención en el matadero. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **211**, 52-62.
- Devirgiliis, C., Zinno, P., Perozzi, G. (2013). Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontiers in Microbiology* **4**, 301.
- Díaz, C. (2011). *Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie*. Trabajo de Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Química. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires.
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31** (2), 173-180.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8** (9), 881-890.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15** (2), 167-193.
- Dover, L. G., Alderwick, L. J., Brown, A. K., Futterer, K., Besra, G. S. (2007). Regulation of cell wall synthesis and growth. *Current Molecular Medicine* **7** (3), 247-276.

- ECDC -*European Centre for Disease Prevention and Control*- (2016). Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Disponible en: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption/antimicrobial_resistance/EARS-Net/Pages/EARS-Net.aspx. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- Echevarría García, L. (2013). Técnicas y métodos de uso de las biopelículas en la búsqueda de procesos de biorremediación. *Scientific International Journal* **10** (3), 32-43.
- Edqvist, L. E., Pedersen, K. B. (2001). Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense, pp. 93-100. En: European Environment Agency (eds.), *Late Lessons from Early Warnings: The Precautionary Principle 1896–2000*. European Environment Agency, Copenhagen.
- EEA -*European Environment Agency*- (2010). Environmental Terminology and Discovery Service (ETDS). Disponible en: http://glossary.eea.europa.eu/terminology/concept_html?term=fungicide. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- EFSA -*European Food Safety Authority*- (2008). 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* **765**, 1-87.
- EFSA -*European Food Safety Authority*- (2016). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal* **14** (2), 4380.
- EFSA-ECDC -*European Food Safety Authority-European Centre for Disease Prevention and Control*- (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* **13**, 4329-4519.
- EPHA -*European Public Health Alliance*- (2012). EPHA Briefing on Antimicrobial Resistance. Antibiotics. Disponible en: <http://epha.org/wp-content/uploads/2012/10/EPHA-Briefing-on-Antimicrobial-Resistance.pdf>. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- Ercan, D., Demirci, A. (2015). Current and future trends for biofilm reactors for fermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology* **35** (1), 1-14.
- Esimbekova, E. N., Asanova, A. A., Deeva, A. A., Kratasyuk, V. A. (2017). Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases. *Food Chemistry* **235**, 294-297.
- Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal* **13** (2), 113-117.
- ESVAC -*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*- (2016). Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014. Trends from 2011 to 2014. Sixth ESVAC report. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2016/10/WC500214217.pdf. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.

- FAO -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- (2017). Definiciones para los fines de *Codex Alimentarius*. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w5975s/w5975s08.htm>. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- FAO -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- (2013). Revisión del desarrollo avícola. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/i3531s/i3531s.pdf>. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- FAO -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- (2014a). Calidad de los animales. Disponible en: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_animal.html. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- FAO -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- (2014b). Consumo de carne. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- FAO -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- (2015). Composición de la carne. 2005. Disponible en: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- FAOSTAT -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- (2017). Base de datos estadísticos de producción-cantidad de ganadería primaria. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- FDA -*US Food and Drug Administration*- (2012). Code of Federal Regulations. Title 21-Food and Drugs. Disponible en: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=3ee286332416f26a91d9e6d786a604ab&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab_02.tpl. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- Fernández Márquez, M. L., Grande Burgos, M. J., López Aguayo, M. C., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R. (2017). Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiology* **62**, 77-81.
- Ferreira, C., Pereira, A. M., Pereira, M. C., Melo, L. F., Simões, M. (2011). Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyldimethyldodecylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66** (5), 1036-1043.
- Flint, S. H., Bremer, P. J., Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling* **11** (1), 81-97.
- Fraqueza, M. J. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* **212**, 76-88.
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science* **11** (4), 147-157.
- Furuya, E. Y., Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology* **4** (1), 36-45.

- Gadea, R., Glibota, N., Pulido, R. P., Gálvez, A., Ortega, E. (2017). Effects of exposure to biocides on susceptibility to essential oils and chemical preservatives in bacteria from organic foods. *Food Control* **80**, 176-182.
- Garrido Frenich, A. (2010). Seguridad alimentaria: Control de residuos y contaminantes. *I Jornadas del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario*, Córdoba.
- Genigeorgis, C. (1995). Biofilm: their significance to cleaning in the meat sector, pp. 29-47. En: Burt, S. A., Bauer, F. (eds.), *New Challenges in Meat Hygiene: Specific Problems in Cleaning and Disinfection*. European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology, Utrech.
- Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412** (6845), 442-445.
- Gilbert, P., McBain, A. J. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **16** (2), 189-208.
- Guerin-Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B., Leveau, J. Y. (2000). Quaternary ammonium compound stresses induce specific variations in fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Food Microbiology* **55** (1), 157-159.
- Guerrero-Ramos, E., Cordero, J., Molina-González, D., Poeta, P., Igrejas, G., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2016). Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiology* **53**, 156-164.
- Gunduz, G. T., Tunzel, G. (2006). Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89** (3-4), 329-336.
- Han, X., Zhu, D., Lai, H., Zeng, H., Zhou, K., Zou, L., Wu, C., Han, G., Liu, S. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broilers at slaughter in China. *Food Control* **69**, 160-170.
- Hancock, I. C. (1991). Microbial cell surface architecture, pp. 23-59. En: Mozes, N., Handley, P. S., Busscher, H. J., Rouxhet P. G. (eds.), *Microbial Cell Surface Analysis*. VCH Publishers, Weinheim, Federal Republic of Germany.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology* **57** (1), 249-273.
- Haug, M. C., Tanner, S. A., Lacroix, C., Stevens, M. J., Meile, L. (2011). Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model. *FEMS Microbiology Ecology* **78** (2), 210-219.
- Helke, D. M., Somers, E. B., Wong, A. C. (1993). Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection* **56** (6), 479-484.

- Hernández-Rodríguez, M., Sastre-Gallego, A. (1999). *Tratado de Nutrición*, 1ª ed. Díaz de Santos, Madrid.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* **387** (10014), 176-187.
- Ibusquiza, P. S., Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L. (2012). Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. *Food Control* **25** (1), 202-210.
- 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.
- Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L., Escartin, E. F. (2007). Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. *Journal of Food Protection* **70** (1), 30-34.
- Jiménez Díaz, R. (2014). La aceituna de mesa como fuente y vehículo de microorganismos saludables. *V Jornadas Internacionales de la Aceituna de Mesa*, Sevilla.
- Jones, G. W., Isaacson, R. E. (2008). Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **10** (3), 229-260.
- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology* **64** (3), 367-372.
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *The International Journal of Artificial Organs* **34** (9), 737-751.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology* **185** (16), 4693-4698.
- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. A. (2000). A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 1549-1555.
- Khameneh, B., Diab, R., Ghazvini, K., Bazzaz, B. S. F. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis* **95**, 32-42.
- Kim, B. R., Bae, Y. M., Hwang, J. H., Lee, S. Y. (2016). Biofilm formation and cell surface properties of *Staphylococcus aureus* isolates from various sources. *Food Science and Biotechnology* **25** (2), 643-648.
- Kirbis, A., Krizman, M. (2015). Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. *Procedia Food Science* **5**, 148-151.

- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* **48** (6), 1511-1524.
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W., Friedrich, A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance* **15** (41), pii=19688.
- Köhler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzhepour, M. M., Pechere, J. C. (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **183** (18), 5213-5222.
- Kumar, A., Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Review* **57**, 1486–1513.
- Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **42** (1), 9-27.
- Leroy, S., Lebert, I., Chacornac, J. P., Chavant, P., Bernardi, T., Talon, R. (2009). Genetic diversity and biofilm formation of *Staphylococcus equorum* isolated from naturally fermented sausages and their manufacturing environment. *International Journal of Food Microbiology* **134** (1), 46-51.
- Lester, C. H., Frimodt-Møller, N., Sørensen, T. L., Monnet, D. L., Hammerum, A. M. (2006). In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50** (2), 596-599.
- Levy, S. B. (2002). From tragedy the antibiotic era is born, pp. 1-14. En: Levy, S. B. (ed.), *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers*, 2nd ed. Perseus Publishing, Cambridge.
- Levy, S. B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* **10**, S122–S129.
- Lillard, H. S. (1985). Bacterial cell characteristics and conditions influencing their adhesion to poultry skin. *Journal of Food Protection* **48** (9), 803-807.
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Disease* **36**, 1-23.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection* **53** (9), 742-746.
- Mah, T. F. C., O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9** (1), 34-39.

- Maillard, J. Y. (2016). Testing the Effectiveness of Disinfectants and Sanitizers, pp. 569-586. En: Lelieveld, H. L. M., Holah, J., Gabric, D. (eds.), *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*, 2nd ed, Elsevier, Amsterdam.
- MAPAMA -Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente- (2016a). El sector del ovino y caprino en cifras. Principales indicadores económicos. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/indicadoreseconomicosdelsectorovinoycaprino2015_tcm7-270866.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- MAPAMA -Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente- (2016b). El sector de la carne de ave en cifras. Principales indicadores económicos en 2015. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosaviculturadecarne2015_tcm7-374471.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- MAPAMA -Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente- (2017a). Biocidas. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/biocidas/>. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- MAPAMA -Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente- (2017b). El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos en 2016. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicoscarnedecerdo2016_tcm7-422853.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- MAPAMA -Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente- (2017c). El sector de la carne de vacuno en cifras. Principales indicadores económicos (Avance). Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/cortoindicadoreseconomicoscarnedevacuno2016-avance_tcm7-267238.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- MAPAMA -Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente- (2017d). La alimentación mes a mes. Febrero 2017. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informemesamesalimentacionfebrero2017_tcm7-456841.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- Marshall, K. C. (1992). Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. Control of biofilm formation awaits the development of a method to prevent bacterial adhesion. *ASM American Society for Microbiology News* **58** (4), 202-207.
- Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R. (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Microbiology* **68** (3), 337-348.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* **157** (11), 2893-2902.

- Marty, E., Buchs, J., Eugster-Meier, E., Lacroix, C., Meile, L. (2012). Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiology* **29** (2), 157-166.
- McLean, R. J., Whiteley, M., Stickler, D. J., Fuqua, W. C. (1997). Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters* **154** (2), 259-263.
- Melo, L., Bott, T. R., Fletcher, M., Capdeville, B. (eds.). (2012). *Biofilms-science and technology*. Vol. 223, 1st ed. Springer Science & Business Media, Alvor (Portugal).
- MERCASA -Mercados Centrales de Abastecimientos, S.A.- (2017). Alimentación en España en 2016. Producción. Industria. Distribución. Consumo. Disponible en: http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2016/pdfs/Alimentacion_en_Espana_web_2016_150px.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- Meyer, B., Cookson, B. (2010). Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *Journal of Hospital Infection* **76** (3), 200-205.
- Midelet, G., Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology* **97** (2), 262-270.
- Moen, B., Rudi, K., Bore, E., Langsrud, S. (2012). Subminimal inhibitory concentrations of the disinfectant benzalkonium chloride select for a tolerant subpopulation of *Escherichia coli* with inheritable characteristics. *International Journal of Molecular Sciences* **13** (4), 4101-4123.
- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**, 329-334.
- Monnet, D. L. (2005). Antibiotic development and the changing role of the pharmaceutical industry. *International Journal of Risk and Safety Medicine* **17**, 133-145.
- Moreira, M. A. S., Oliveira, J. A., Teixeira, L. M., Moraes, C. A. (2005). Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. *Veterinary Microbiology* **109** (1), 75-81.
- Mosquera-Fernández, M., Sanchez-Vizueté, P., Briandet, R., Cabo, M. L., Balsa-Canto, E. (2016). Quantitative image analysis to characterize the dynamics of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International Journal of Food Microbiology* **236**, 130-137.
- Müller, A., Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stessl, B., Guinane, C. M., Cotter P. D., Wagner, M. Schmitz-Esser, S. (2013). Tn 6188-a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One* **8** (10), e76835.
- Nitromex (2017). Fosfatos alimenticios. Disponible en: <http://www.nitromex.mx/area-de-alimentos/productos-alimentos/fosfatos-alimenticios>. Fecha del último acceso: 5 de Junio de 2017.

- Nivens, D. E., Palmer Jr., R. J., White, D. C. (1995). Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. *Journal of Industrial Microbiology* **15** (4), 263-276.
- Notermans, S., Kampelmacher, E. H. (1974). Attachment of some bacterial strains to the skin of broiler chickens. *British Poultry Science* **15** (6), 573-585.
- OJEC -*Official Journal of European Union*- (1998). Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. *Official Journal of the European Communities* 24/04/1998 L123, 1-63. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0008&from=EN>. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- O'Leary, D., McCabe, E. M., McCusker, M. P., Martins, M., Fanning, S., Duffy, G. (2013). Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. *International Journal of Food Microbiology* **161** (1), 36-43.
- Oliveira, A. R., Domingues, F. C., Ferreira, S. (2017). The influence of resveratrol adaptation on resistance to antibiotics, benzalkonium chloride, heat and acid stresses of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **73**, 1420-1425.
- Oniciuc, E.-A., Ariza-Miguel, J., Bolocan, A.-S., Díez-Valcarce, M., Rovira, J., Hernández, M., Fernández-Natal, I., Nicolau, A. I., Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *International Journal of Food Microbiology* **209**, 34-38.
- Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, M. A., Grande Burgos, M. J., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **162** (1), 13-25.
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiology* **39**, 81-88.
- O'Sullivan, M. (2016). *A handbook for sensory and consumer-driven new product development: innovative technologies for the food and beverage industry*. Elsevier, Amsterdam.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology* **54** (1), 49-79.
- Palmer, M., Chan, A., Dieckmann, T., Honek, J. (2013). *Notes to biochemical pharmacology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Pardo Hernández, D. (2014). *Susceptibilidad bacteriana frente a cuatro soluciones germicidas*. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Tolima, Colombia.

- Patel, J., Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology* **139** (1), 41-47.
- Paulsen, L. T., Park, J. H., Choi, P. S., Saier, M. H. (1997). A family of gram negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **156** (1), 1-8.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96** (20), 11229-11234.
- Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* **92** (S1), 55S-64S.
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56** (1), 20-51.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology* **175** (22), 7363-7372.
- Potenski, C. J., Ghandi, M., Matthews, K. R. (2003). Exposure of *Salmonella* Enteritidis to chlorine of food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* **220** (2), 181-186.
- Prosser, J. I. (1999). Quorum sensing in biofilms, pp. 79-88. En: Newman, H. N., Wilson, M. (eds.), *Dental plaque revisited—oral biofilms in health and disease*. Bionline, London.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J. Piddock, L. J. V., Webber, M. A. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60** (6), 1273-1280.
- Ravishankar, S., Zhu, L., Jaroni, D. (2010). Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. *Food Microbiology* **27** (6), 791-794.
- Ribeiro, S. M., Felício, M. R., Boas, E. V., Gonçalves, S., Costa, F. F., Samy, R. P., Santos, R. C., Franco, O. L. (2016). New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & Therapeutics* **160**, 133-144.
- Rice, L. B. (2009). The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current Opinion in Microbiology* **12** (5), 476-481.
- Rizzotti, L., Rossi, F., Torriani, S. (2016). Biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the swine meat chain. *Food Microbiology* **60**, 160-164.
- Romney, A. J. D. (1990). *CIP: cleaning in place*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, New York.

- Rosen, B. A., Appeltaum, B., Hult, S. C. (1981). Isolation and identification of the surface receptors of *Streptococcus sanguis* responsible for adherence to hydroxyapatite, pp. 201-225. En: Berkeley, R. C., Lynch, J. M., Melling, J., Rutter, P. R., Vincent, B. (eds.), *Microbial Adhesion to Surfaces*. Halstead, New York.
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). The landscape of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* **117** (6), 245-250.
- Ross, S. S., Tu, M. H., Falsetta, M. L., Ketterer, M. R., Kiedrowski, M. R., Horswill, A. R., Apicella, M. A., Reinhardt, J. M., Fiegel, J. (2014). Quantification of confocal images of biofilms grown on irregular surfaces. *Journal of Microbiological Methods* **100**, 111-120.
- Ryu, J. H., Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (1), 247-254.
- Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J., Ramadan, H. H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope* **115** (4), 578-582.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **65** (5), 725-759.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* **184** (4), 1140-1154.
- SCENIHR -Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks- (2009). Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf. Fecha del último acceso: 5 de junio de 2017.
- Scher, K., Romling, U., Yaron, S. (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (3), 1163-1168.
- Scherer, K., Bartelt, E., Sommerfeld, C., Hildebrandt, G. (2006). Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. *Journal of Food Protection* **69** (4), 757-761.
- Schlafer, S., Meyer, R. L. (2016). Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods* **138**, 50-59.
- SDS -Secretaría Distrital de Salud de Bogotá- (2011). Limpieza y desinfección de equipos y superficies ambientales en instituciones prestadoras de servicios de salud. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Limpieza%20y%20Desinfecci%C3%B3n%20de%20Equipos%20y%20Superficies.pdf>. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.

- Sharma, M., Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case. *Food Control* **13** (6), 469-477.
- Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology* **20** (9), 407-413.
- Shikongo-Nambabi, M. N. N., Chimwamurombe, P. M., Venter, S. N. (2010). Factors impacting on the microbiological quality and safety of processed hake. *African Journal of Biotechnology* **9** (49), 8405-8411.
- Simoës, M., Pereira, M. O., Vieira, M. J. (2005). Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Research* **39** (20), 5142-5152.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., Vieira, M. J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioprocess Processing* **84** (4), 338-345.
- Sinde, E., Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology* **17** (4), 439-447.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28** (1), 12-55.
- Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* **18**, 96-104.
- Sosa, A. D. J., Amábile-Cuevas, C. F., Byarugaba, D. K., Hsueh, P. R., Kariuki, S., Okeke, I. N. (eds.). (2009). *Antimicrobial resistance in developing countries*. Springer, New York.
- Spížek, J., Řezanka, T. (2004). Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64** (4), 455-464.
- Stewart, P. S. (1996). Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (11), 2517-2522.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S., Klapper, I. (2002a). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **29** (6), 361-367.
- Stoodley, P., Jacobsen, A., Dunsmore, B. C., Purevdorj, B., Wilson, S., Lappin-Scott, H. M., Costerton, J. W. (2001). The influence of fluid shear and AlCl₃ on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. *Water Science and Technology* **43** (6), 113-120.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M. (1999). Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an *in situ* investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and Bioengineering* **65** (1), 83-92.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002b). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology* **56** (1), 187-209.
- Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P., Geesey, G. G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38** (9), 2125-2133.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147** (1), 3-9.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K. R., Chikindas, M. L., Yaron, S. (2007). Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters* **267** (2), 200-206.
- Talon, R., Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science* **89** (3), 303-309.
- Teale, C. J. (2002). Antimicrobial resistance and the food chain. *Journal of Applied Microbiology* **92** (S1), 85S-89S.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Food Infection Control* **34** (5 S1), S3-S10; discussion S64-S73.
- Teramoto, H., Salaheen, S., Biswas, D. (2016). Contamination of post-harvest poultry products with multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in Maryland-Washington DC metro area. *Food Control* **65**, 132-135.
- Tezel, U., Pavlostathis, S. G. (2015). Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology* **33**, 296-304.
- Thomas, C. J., McMeekin, T. A. (1980). Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. *Applied and Environmental Microbiology* **40** (1), 133-144.
- Thomas, C. M., Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3** (9), 711-721.
- Thompson, F. L., Abreu, P. C., Cavalli, R. (1999). The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture* **174** (1), 139-153.
- Tuomanen, E., Durack, D. T., Tomasz, A. (1986). Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30** (4), 521-527.
- Tynkkynen, S., Singh, K. V., Varmanen, P. (1998). Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. *International Journal of Food Microbiology* **41** (3), 195-204.

- Uhlich, G. A., Cooke, P. H., Solomon, E. B. (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (4), 2564-2572.
- Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J. G., Beaudet, R., Shareck, F., Villemur, R. (2001). Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (6), 2404-2409.
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases* **14** (8), 742-750.
- Van den Bogaard, A. E., Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **14** (4), 327-335.
- Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. (2011). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology* **193** (3), 157-168.
- Vatsos, I. N., Thompson, K. D., Adams, A. (2001). Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Letters in Applied Microbiology* **33** (3), 178-182.
- Wagner, T., Soong, G., Sokol, S., Saiman, L., Prince, A. (2005). Effects of azithromycin on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *CHEST Journal* **128** (2), 912-919.
- Walton, J. R. (1996). Benefits of antibiotics in animal feed, pp. 19-46. En: Gainswothy, P. C., Wiseman, J. (eds.), *Recent advances in animal nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham.
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G. (2013). In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology* **167** (3), 293-302.
- Wang, W., Zhou, X., Suo, Y., Deng, X., Cheng, M., Shi, C., Shi, X. (2017). Prevalence, serotype diversity, biofilm-forming ability and eradication of *Listeria monocytogenes* isolated from diverse foods in Shanghai, China. *Food Control* **73**, 1068-1073.
- Warner, J. C., Rothwell, S. D., Keevil, C. W. (2008). Use of episcopic differential interference contrast microscopy to identify bacterial biofilms on salad leaves and track colonization by *Salmonella* Thompson. *Environmental Microbiology* **10** (4), 918-925.
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., Kjelleberg, S. (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology* **185** (15), 4585-4592.
- Weiler, C., Ifland, A., Naumann, A., Kleta, S., Noll, M. (2013). Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *International Journal of Food Microbiology* **161** (2), 61-68.

- Whitehead, K. A., Verran, J. (2015). Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science* **2**, 84-91.
- WHO -World Health Organization- (2002). Antimicrobial resistance. Fact sheet N° 194. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- WHO -World Health Organization- (2009). Antimicrobial Resistance. Related WHO publicatons on antimicrobial resistance. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/en/. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- WHO -World Health Organization- (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf. Fecha del último acceso: 9 de junio de 2017.
- Yang, X., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Liu, S., Guo, W., Cai, S., Yu, S. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control* **60**, 50-56.
- Yilmaz, Ç., Özcengiz, G. (2016). Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochemical Pharmacology* **133**, 43-62.
- Zhang, S., Wu, Q., Zhang, J., Lai, Z., Zhu, X. (2016). Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* in retail ready-to-eat foods in China. *Food Control* **68**, 236-243.
- Zoltai, P. T., Zottola, E. A., McKay, L. L. (1981). Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. *Journal of Food Protection* **44** (3), 204-208.
- Zottola, E. A., Sasahara, K. C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology* **23** (2), 125-148.

RESUMEN

RESUMEN

CAPÍTULO I

Se estudió la calidad microbiológica de preparados de carne de ave crudos adquiridos en establecimientos de venta al público de la ciudad de León. Se determinaron los niveles microbianos (microbiota aerobia viable -MAV-, microorganismos psicotrofos, enterobacterias, coliformes fecales, enterococos, pseudomonas, pseudomonas fluorescentes, el grupo de mohos y levaduras y *Staphylococcus aureus*) en carne picada, hamburguesas, *nuggets*, salchichas blancas, salchichas rojas, escalope y rollitos. Los aislamientos de *S. aureus* se ensayaron para determinar su susceptibilidad a 20 antimicrobianos de importancia en medicina humana y en veterinaria (método de difusión por disco, CLSI). La carga microbiana media (\log_{10} ufc/g) osciló entre $2,63 \pm 0,80$ (enterococos) y $6,66 \pm 1,09$ (psicotrofos). Los recuentos medios de MAV ($6,44 \pm 1,16 \log_{10}$ ufc/g) se consideraron aceptables en base a los criterios microbiológicos de la Unión Europea. El tipo de producto influyó ($P < 0,05$) en los recuentos microbianos, presentando las muestras de escalope los niveles más elevados para la mayoría de los grupos microbianos. Dos tercios (66,7%) de las muestras estaban contaminadas con *S. aureus*. Todos los aislamientos de *S. aureus* fueron multiresistentes (a entre tres y quince antimicrobianos). La mayor prevalencia de resistencia se observó para ampicilina, oxacilina, penicilina G, ceftazidima y ácido nalidíxico. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que los preparados de carne de ave presentan una elevada carga microbiana y son un reservorio importante de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos. Dichos hallazgos enfatizan la necesidad de una correcta manipulación de estos alimentos para reducir el riesgo para el consumidor.

CAPÍTULO II

Los estafilococos resistentes a la meticilina (*methicillin-resistant staphylococci*; MRS) son un problema de importancia creciente, tanto en el ámbito de la Salud Pública como de la Sanidad Animal. En este trabajo se estudió la susceptibilidad de 30 cepas de MRS (*Staphylococcus aureus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri* y *S. xylosus*) procedentes de preparados cárnicos (de

mamíferos y aves) frente a 11 antimicrobianos de importancia clínica pertenecientes a siete grupos diferentes. Se emplearon dos métodos: la técnica estándar de difusión por disco en placas de agar Mueller-Hinton y un sistema miniaturizado disponible comercialmente (*Sensi Test Gram-positive*). Un hallazgo destacable es que 16 cepas (53,3% del total) exhibieron un fenotipo de resistencia de espectro extendido (*extensively drug-resistant phenotype*; XDR). El número medio de resistencias por cepa fue de 4,67. Estos resultados sugieren que los preparados cárnicos adquiridos en establecimientos de venta al público son un vehículo probable de transmisión de cepas de MRS con resistencias múltiples. La resistencia a eritromicina fue la más frecuentemente detectada (76,7% de las cepas), seguida por la resistencia a tobramicina, ceftazidima (66,7%), ciprofloxacina (56,7%) y fosfomicina (53,3%). Se encontró una concordancia (coeficiente *kappa*) del 64% entre los dos métodos comparados. Considerando el método de difusión por disco como la técnica de referencia, la sensibilidad, especificidad y eficiencia de la prueba miniaturizada fueron del 98,44%, 69,64% y 83,33%, respectivamente. La mayor parte de las discrepancias entre los dos métodos se debieron a aislamientos que resultaron susceptibles empleando la técnica estándar y resistentes con el método miniaturizado (falsos positivos).

CAPÍTULO III

En este trabajo se investigó el efecto de concentraciones subinhibitorias de tres biocidas (cloruro de benzalconio -CB-, fosfato trisódico -FTS- e hipoclorito sódico -HIP-) sobre la arquitectura y viabilidad de los *biofilms* formados por una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA 48a) de origen alimentario. Tras la tinción con SYTO9 y yoduro de propidio, se examinaron las imágenes por medio de microscopía láser confocal de barrido (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM). Las concentraciones subinhibitorias de CB o FTS redujeron la capacidad de MRSA para formar *biofilms*. En cambio, la presencia de concentraciones subinhibitorias de HIP mejoró la habilidad de MRSA para producir *biofilms* cuando las células habían sufrido una adaptación previa a este compuesto (para *biofilms* formados en presencia de HIP, el biovolumen en el campo observado fue de $137.785,31 \pm 47.682,79 \mu\text{m}^3$; en ausencia de biocidas fue de $70.204,13 \pm 31.603,98 \mu\text{m}^3$; $P < 0,05$). Se observó la mayor cantidad de células vivas (teñidas de verde) en *biofilms* que crecieron en presencia de HIP en relación al resto de

condiciones probadas ($58.999,75 \pm 55.312,37 \mu\text{m}^3$ vs $31.976,29 \pm 38.594,98 \mu\text{m}^3$; $P < 0,05$). En este trabajo se pone de manifiesto por primera vez que la presencia de HIP en concentraciones subinhibitorias induce la formación de *biofilms* por MRSA. Estos resultados sugieren que el uso repetido de hipoclorito sódico a bajas concentraciones puede representar un riesgo para la Salud Pública.

CAPÍTULO IV

El objetivo de este estudio ha sido investigar el efecto de concentraciones inferiores a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de tres biocidas de uso en las industrias alimentarias (cloruro de benzalconio -CB-, fosfato trisódico -FTS- e hipoclorito sódico -HIP-) en las biopelículas formadas por *Salmonella*. Se estudiaron, mediante microscopía láser confocal de barrido (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM), tras tinción con SYTO9 y yoduro de propidio, los parámetros estructurales y la viabilidad de los *biofilms* formados por una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium aislada de carne de ave. Las CMIs de *Salmonella* antes de la exposición a concentraciones subinhibitorias de los biocidas fueron de 8,0 $\mu\text{g/ml}$ (CB), 18,0 mg/ml (FTS) y 6,0 mg/ml (HIP). Los cultivos presentaron una tolerancia adquirida estable frente al CB y al HIP. Las concentraciones máximas de biocidas que permitieron el crecimiento bacteriano tras la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los compuestos fueron 30,4 $\mu\text{g/ml}$ (CB) y 10,1 mg/ml (HIP). La arquitectura y viabilidad de los *biofilms* de *S. Typhimurium* variaron en función de la exposición previa a concentraciones subinhibitorias de los diferentes compuestos. La adaptación previa a HIP incrementó ($P < 0,001$) la formación de *biofilm* (biovolumen medio en el campo observado [$14.161 \mu\text{m}^2$]: $139.856,15 \pm 155.213,27 \mu\text{m}^3$) en relación con las células no expuestas ($53.779,05 \pm 55.535,62 \mu\text{m}^3$) y las previamente expuestas a CB ($58.216,97 \pm 58.644,45 \mu\text{m}^3$) o FTS ($30.052,13 \pm 28.290,56 \mu\text{m}^3$). Este hecho fue particularmente marcado cuando los *biofilms* se formaron en ausencia de biocidas o en presencia de concentraciones subinhibitorias de HIP. Los *biofilms* formados por los cultivos previamente expuestos a FTS presentaron mayor porcentaje de células muertas que el resto de cultivos ($34,08 \pm 13,74\%$ vs $23,70 \pm 16,16\%$; $P < 0,001$). Los resultados de este trabajo enfatizan la importancia de mantener concentraciones de HIP superiores a la CMI durante los procesos de limpieza y desinfección en las industrias de alimentos para reducir el riesgo de salmonelosis de origen alimentario asociadas a *biofilms*.

CAPÍTULO I

**Calidad microbiológica y patrones de resistencia a antibióticos de
Staphylococcus aureus en diferentes tipos de preparados de carne de ave**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La carne de pollo es la de mayor consumo en España, donde el consumo anual per cápita de este alimento en 2015 fue de 13,78 kg, cifra que supuso el 37,1% del consumo total de carne fresca (MAGRAMA, 2016). En el ámbito mundial, la carne de pollo es la segunda más consumida, con 14,99 kg anuales per cápita, siendo superada únicamente por la carne de cerdo, cuyo consumo alcanza los 16,02 kg por persona y año (FAO, 2017). Este elevado consumo de carne de pollo está en relación con varios factores. En primer lugar, se trata de un alimento de bajo precio, de fácil elaboración, bien apreciado sensorialmente por los consumidores, percibido como nutritivo y saludable, y aceptado por prácticamente todas las culturas y religiones (p. ej. musulmanes o hindúes). Además, se presta a un amplio rango de tratamientos tecnológicos, permitiendo así satisfacer las demandas de los consumidores, que demandan con cada vez más frecuencia productos cárnicos listos para ser cocinados (por ejemplo, preparados cárnicos), puesto que el ahorro de tiempo en la preparación de los alimentos se ha convertido en una prioridad para la mayoría de los consumidores (Selvan *et al.*, 2007).

En el contexto planteado, la contaminación microbiológica de la carne de ave con microorganismos patógenos se ha convertido un problema de Salud Pública mundial. Así, la carne de ave y sus productos derivados fueron responsables de al menos el 9,5% de los brotes de enfermedad transmitida por alimentos en la Unión Europea en 2015 (EFSA-ECDC, 2016). Por otro lado, la presencia de microorganismos alterantes es también una preocupación para la Industria Cárnica, dadas las pérdidas económicas que ello conlleva. La microbiota aerobia viable (MAV), los microorganismos psicrotrofos, las enterobacterias, los microorganismos coliformes fecales, los enterococos, las pseudomonas, las pseudomonas fluorescentes y el grupo de mohos y levaduras han sido tradicionalmente empleados para determinar la calidad higiénico-sanitaria y estimar la vida útil de la carne de ave (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002; Del Río *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus es el agente etiológico de la intoxicación estafilocócica, una forma de gastroenteritis provocada por la ingestión de una o más toxinas estafilocócicas preformadas en los alimentos (Seok & Bohach, 2007). En el año 2015 se produjeron en la Unión Europea 434 brotes de intoxicación estafilocócica (cifra que supuso el 9,9% del total de brotes de transmisión alimentaria). La carne de mamíferos y aves y los productos cárnicos se encontraron entre los principales alimentos implicados en estos procesos (EFSA-ECDC, 2016). Adicionalmente, *S. aureus* es el agente

etiológico de diversas infecciones humanas. Aunque no es la vía más habitual, estas infecciones pueden ocurrir en la comunidad (fuera del ámbito hospitalario) por el consumo o la manipulación de alimentos contaminados. De hecho, en los últimos años se han descrito infecciones de origen alimentario por este microorganismo en personas sanas, no pertenecientes a ningún grupo de riesgo (Capita & Alonso-Calleja, 2013; Buzón-Durán *et al.*, 2017).

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en los alimentos supone un peligro importante para la Salud Pública. En primer lugar, existe un peligro indirecto derivado de la posible transferencia a las poblaciones humanas de microorganismos patógenos resistentes. Por otro lado, las bacterias resistentes a antibióticos representan un reservorio de genes de resistencia transferibles a otros microorganismos más virulentos a lo largo de la cadena de producción de alimentos (Capita & Alonso-Calleja, 2013). La monitorización de la resistencia a antibióticos en las diferentes áreas geográficas es fundamental para obtener información sobre la dimensión y tendencias de este importante problema de Salud Pública, así como para planificar y evaluar la efectividad de diferentes medidas de control. Sin embargo, la información disponible sobre la resistencia a antibióticos de *S. aureus* en carne y productos cárnicos es muy limitada, y en base a la revisión bibliográfica realizada, podemos decir que estos estudios son inexistentes en el noroeste de España.

Los objetivos de este trabajo han sido conocer la calidad microbiológica de diferentes preparados de carne de ave a nivel de establecimientos de venta al público del noroeste de España y determinar el perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *S. aureus* aisladas de dichos alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras

Se tomaron un total de 30 muestras de preparados de carne de pollo. Las muestras fueron obtenidas, entre los días 0 y 3 de procesado, en diferentes establecimientos comerciales de la ciudad de León (tres supermercados, tres carnicerías y tres pollerías). Se adquirieron diferentes tipos de preparados cárnicos: carne picada (cinco muestras), hamburguesas (ocho), *nuggets* (tres), salchichas blancas (cinco), salchichas rojas (cinco), escalope (dos) y rollitos elaborados con pechuga de pollo, jamón curado y queso (dos). Las muestras, que pesaban aproximadamente 300 g cada una, se introdujeron, de forma inmediata tras su recogida, en bolsas de plástico estériles individuales y se transportaron en una nevera portátil al laboratorio, donde fueron almacenadas a 4 ± 1 °C. Los análisis se realizaron en el plazo máximo de 4 horas desde la recepción de las muestras.

Análisis microbiológico

A partir de cada muestra se tomaron alícuotas de 10 g, que fueron homogeneizadas, junto con 90 ml de agua de peptona (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) al 0,1% durante dos minutos en un homogeneizador de paletas (Masticator, IUL, Barcelona, España). En el caso de las hamburguesas, *nuggets*, salchichas, escalope y rollitos, los 10 g de muestra estaban constituidos por dos o más piezas de producto. A partir del homogeneizado se realizaron diluciones decimales en el mismo diluyente. En la Tabla I.1. se indican los medios de cultivo (todos de Oxoid Ltd.) y los parámetros de incubación usados. La siembra se realizó por duplicado y las placas se incubaron bajo condiciones de aerobiosis. Las colonias de *Pseudomonas fluorescens* crecidas en el medio *Pseudomonas* CFC se contaron bajo una lámpara de luz ultravioleta (254 nm; Palleroni, 1984).

Se tomaron, para cada muestra, entre una y cinco colonias con la morfología típica de *S. aureus* (colonias brillantes de color negro rodeadas de un halo opaco) a partir del medio de Baird-Parker. Las cepas fueron caracterizadas en base a la tinción por el método Gram, la producción de catalasa y la actividad oxidasa. Los aislamientos que se correspondían con cocos Gram-positivos, catalasa positivos y oxidasa negativos se identificaron con ayuda del sistema miniaturizado API STAPH (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. La interpretación de los resultados se llevó a cabo usando la base de datos API LAB Plus versión 7.0.

(bioMérieux), con el software de identificación Apiweb™ (bioMérieux). Se tomó una única cepa de *S. aureus* por cada muestra positiva para realizar las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.

Tabla I.1. Medios de cultivo, tiempos y temperaturas de incubación y referencias usadas para realizar los análisis microbiológicos.

Grupo microbiano	Medio de cultivo ⁴	Incubación		Referencia
		T ^a (°C)	Tiempo	
Microbiota aerobia viable (MAV) ¹	PCA	30	72 h	Jay (2002)
Psicrotrofos ¹	PCA	7	10 d	Cousin <i>et al.</i> (2001)
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{2, 3}	VRBGA	35	24 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
Coliformes fecales ^{2, 3}	VRBA	45	24 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
Enterococos ²	KAA	42	24 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
<i>Pseudomonas</i> spp. ¹	CFC	25	48 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
Mohos y levaduras ¹	OGYEA	25	5 d	Baird <i>et al.</i> (1987)
<i>Staphylococcus aureus</i> ¹	BP	35	48 h	Lancette & Tatini (1992)

¹ Técnica de siembra en superficie (0,1 ml); ² técnica de siembra en profundidad (1 ml); ³ adición de sobrecapa. ⁴ PCA, agar para recuento en placa (*plate count agar*); VRBGA, agar violeta, rojo neutro, sales biliares, glucosa (*violet red bile glucose agar*); VRBA, agar violeta, rojo neutro, sales biliares (*violet red bile agar*); KAA, agar kanamicina, esculina, azida sódica (*kanamycin aesculin azide agar*); *Pseudomonas* agar con suplemento de cefaloridina, fucidina y ceftrimida (CFC); OGYEA, agar oxitetraciclina, glucosa, extracto de levadura (*oxytetracycline glucose yeast extract agar*); BP, agar de Baird-Parker con emulsión de yema de huevo y telurito.

Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad de los aislamientos de *S. aureus* frente a un panel de 20 antimicrobianos en agar Mueller-Hinton (Oxoid) mediante el método de difusión por disco (CLSI, 2013). Se emplearon los siguientes discos de antibióticos (Oxoid): amikacina (AK; 30 µg), gentamicina (CN; 10 µg); tobramicina (TOB; 10 µg), estreptomina (S; 10 µg), ampicilina (AMP; 10 µg), oxacilina (OX; 1 µg), penicilina G (P; 10 units), cefazolina (KZ; 30 µg), cefoxitina (FOX; 30 µg), ceftazidima (CAZ; 30 µg), imipenem (IMP; 10 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25 µg), teicoplanina (TEC; 30

μg), vancomicina (VA; 30 μg), eritromicina (E; 15 μg), cloranfenicol (C; 30 μg), ácido nalidíxico (NA; 30 μg), ciprofloxacina (CIP; 5 μg), tetraciclina (TE; 30 μg) y rifampicina (RD, 5 μg). Para el control de calidad de los discos de antibióticos se utilizó la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213. Tras incubación a 35 °C durante 18-24 horas, se midieron los halos de inhibición y las cepas se clasificaron como susceptibles, de susceptibilidad intermedia o resistentes en base a los criterios del CLSI.

Análisis estadístico

Los recuentos microbianos se transformaron en \log_{10} ufc/g. Los datos se analizaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan para la separación de medias. Los datos de prevalencia de resistencia a antibióticos se compararon con ayuda de las pruebas de Chi-Cuadrado y Fisher. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Todas las pruebas se llevaron a cabo con ayuda del programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad microbiológica

Los niveles microbianos de los preparados de carne de pollo se muestran en la Tabla I.2. Los recuentos microbianos medios oscilaron entre $2,63 \pm 0,80 \log_{10}$ ufc/g (enterococos) y $6,66 \pm 1,09 \log_{10}$ ufc/g (psicrotrofos). Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tipos de muestras para todos los grupos microbianos con la excepción de enterobacterias y coliformes fecales. Es remarcable el hecho de que las muestras de escalope presentaron niveles particularmente elevados de microbiota aerobia viable (MAV), psicrotrofos, *Pseudomonas*, mohos y levaduras y *S. aureus*.

Los recuentos medios de **microbiota aerobia viable (MAV)** fueron de $6,44 \pm 1,16 \log_{10}$ ufc/g. Este valor es superior a los recuentos obtenidos con anterioridad para canales de pollo ($5,19 \pm 0,43 \log_{10}$ ufc/g; Capita *et al.*, 2002) y muslos de pollo (de $5,10 \pm 0,59$ a $5,79 \pm 0,64 \log_{10}$ ufc/g; Álvarez-Astorga *et al.*, 2002; Del Río *et al.*, 2007). Los mayores niveles encontrados en preparados cárnicos, respecto a canales y muslos, son probablemente debidos a la contaminación ocurrida durante el procesado. Nuestros resultados encajan en el rango de resultados (\log_{10} ufc/g) encontrados en preparados de carne de pollo, tanto en España (de $6,29 \pm 0,64$ a $7,28 \pm 0,51$; Álvarez-Astorga *et al.*, 2002) como fuera de nuestras fronteras ($6,05 \pm 0,18$; Lerasle *et al.*, 2014).

En la Unión Europea se aplica un plan de muestreo de tres categorías ($n = 5$, $c = 2$, $m = 5,70 \log_{10}$ ufc/g y $M = 6,70 \log_{10}$ ufc/g) para MAV en carne picada al final del proceso de elaboración (Reglamento -UE- 2073/2005; OJEU, 2005). Según esta normativa, los resultados son satisfactorios si todos los valores (n) observados son menores que m , aceptables si un máximo de c valores están comprendidos entre m y M y el resto de los valores observados son menores que m , e insatisfactorios si uno o más valores observados son mayores que M o más de c valores están situados entre m y M . En el presente estudio se observaron recuentos medios de MAV situados entre m y M , por lo que las muestras se encuadraron en la categoría de aceptable. En adición a la normativa citada, existen guías y recomendaciones para monitorizar la calidad microbiológica de la carne (IFST, 1997; ICMSF, 2011). Los niveles de MAV observados en el presente trabajo no se ajustan a estas guías internacionales de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF; $5 \log_{10}$ ufc/g) y están próximos al límite superior de aceptabilidad ($7 \log_{10}$ ufc/g). Valores superiores a $7 \log_{10}$ ufc por gramo están generalmente asociados con incipientes alteraciones organolépticas (ICMSF, 1986). Debe señalarse, no

obstante, que los criterios mencionados hacen referencia a preparados cárnicos al final del proceso de elaboración, mientras que en el trabajo que se presenta aquí las muestras fueron analizadas al cabo de un tiempo (hasta tres días) tras el procesado. Es muy probable que durante el tiempo transcurrido desde la elaboración hasta el análisis los niveles bacterianos se hayan incrementado respecto a los recuentos iniciales, como ha sido puesto de manifiesto con anterioridad (Del Río *et al.*, 2007).

Los recuentos medios de **microorganismos psicrotrofos** observados en nuestra investigación ($6,66 \pm 1,09 \log_{10}$ ufc/g) son superiores a los encontrados con anterioridad en canales de pollo, de $4,84 \pm 0,60 \log_{10}$ ufc/g (Capita *et al.*, 2001) y muslos de pollo (entre $4,34 \pm 0,77$ y $7,07 \pm 1,07 \log_{10}$ ufc/g; Álvarez-Astorga *et al.*, 2002; Del Río *et al.*, 2007). Todas las muestras del presente estudio exceden también el límite orientativo máximo establecido por Pascual-Anderson (1992) para carne de aves de corral en España, que es de $5 \log_{10}$ ufc/g. Por otro lado, los resultados de este trabajo encajan en el amplio rango de valores (entre 3,5 y $10,7 \log_{10}$ ufc/g) observado por otros autores (Gashe & Mpuchane, 2000) para productos derivados de carne de ave (incluyendo carne picada).

Ninguna de las muestras examinadas presentó signos de alteración organoléptica, a pesar de que algunas contenían más de $8 \log_{10}$ ufc/g de microorganismos psicrotrofos. Estos resultados coinciden con los hallazgos de El-Leithy & Rashad (1989). Por el contrario, Dainty & Mackey (1992) pusieron de manifiesto que niveles de psicrotrofos de entre 6 y $8 \log_{10}$ ufc/g eran suficientes para modificar el olor y la apariencia de la carne.

Los niveles de **Enterobacteriaceae** y de microorganismos coliformes fecales han sido usados como indicadores de contaminación fecal de la carne fresca (Capita *et al.*, 2002). Los recuentos medios de enterobacterias del presente trabajo ($2,89 \pm 0,77 \log_{10}$ ufc/g) se situaron por encima de los límites de los criterios microbiológicos fijados para carne de ave en España, de $2 \log_{10}$ ufc/g (Pascual-Anderson, 1992).

Tabla I.2. Recuentos microbianos (\log_{10} ufc/g; media \pm STD) en preparados de carne de pollo crudos.

Tipo de muestra	Grupo microbiano								
	MAV	Psicrotrofos	Enterobacterias	Coliformes fecales	Enterococos	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> fluorescentes	Mohos y levaduras	<i>S. aureus</i> ¹
Carne picada	6,46 \pm 1,08ab	6,25 \pm 0,83a	2,99 \pm 0,94a	2,97 \pm 0,53a	1,98 \pm 1,07a	5,50 \pm 1,26a	3,63 \pm 0,81a	5,43 \pm 1,28ab	3,99 \pm 1,05abc
Hamburguesas	6,78 \pm 0,86ab	7,26 \pm 0,71ab	3,01 \pm 0,72a	3,08 \pm 0,77a	2,61 \pm 0,95ab	5,17 \pm 0,91a	3,30 \pm 1,00ab	5,75 \pm 0,84ab	3,85 \pm 0,74abc
<i>Nuggets</i>	6,80 \pm 1,82ab	6,88 \pm 2,00a	2,32 \pm 0,81a	2,07 \pm 0,72a	2,50 \pm 0,45ab	5,14 \pm 1,42a	2,10 \pm 0,17b	5,43 \pm 1,25ab	3,54 \pm 0,83ab
Salchichas blancas	5,90 \pm 1,01a	5,99 \pm 0,97a	2,91 \pm 0,93a	2,98 \pm 0,85a	2,58 \pm 0,21ab	4,78 \pm 0,41a	3,29 \pm 0,83ab	5,49 \pm 1,05ab	3,39 \pm 0,34a
Salchichas rojas	5,82 \pm 1,00a	6,50 \pm 0,88a	2,86 \pm 0,59a	2,62 \pm 0,37a	2,77 \pm 0,57ab	5,00 \pm 0,43a	3,68 \pm 0,91a	5,72 \pm 0,76ab	4,43 \pm 0,70bc
Escalope	7,90 \pm 0,93b	8,27 \pm 0,65b	3,00 \pm 1,07a	3,06 \pm 1,20a	2,99 \pm 0,23ab	7,05 \pm 0,67b	2,15 \pm 0,21b	6,56 \pm 0,22a	4,69 \pm 0,46c
Rollitos	6,50 \pm 1,66ab	6,83 \pm 1,32a	2,68 \pm 0,80a	2,77 \pm 0,88a	3,47 \pm 0,74b	6,06 \pm 1,34ab	2,63 \pm 0,46ab	5,07 \pm 0,69b	4,67 \pm 0,25c
Media	6,44 \pm 1,16	6,66 \pm 1,09	2,89 \pm 0,77	2,86 \pm 0,76	2,63 \pm 0,80	5,24 \pm 0,99	3,13 \pm 0,91	5,61 \pm 0,96	4,07 \pm 0,80

Los datos en la misma columna que no comparten ninguna letra son significativamente diferentes ($P < 0,05$); ¹ para establecer los valores medios solo se consideraron las muestras positivas (66,7% del total).

Los recuentos de **coliformes fecales** detectados en este estudio ($2,86 \pm 0,76 \log_{10}$ ufc/g), fueron similares a los observados por Del Río *et al.* (2007) en muslos de pollo obtenidos inmediatamente después del sacrificio ($2,86 \pm 0,58 \log_{10}$ ufc/g de piel) y a los obtenidos en trabajos previos realizados con canales de pollo adquiridas a nivel de establecimientos de venta al público ($2,73 \pm 0,29 \log_{10}$ ufc/g; Capita *et al.*, 2002). Los niveles de contaminación encontrados por otros autores oscilaron entre $1,71 \pm 0,29 \log_{10}$ ufc/g (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013) y $4,1 \log_{10}$ ufc/g (Abu-Ruwaida *et al.*, 1994). Este amplio rango de valores puede ser debido a diferencias en las técnicas de análisis utilizadas. Así, en un estudio previo (Capita *et al.*, 2002) los recuentos de coliformes en carne de pollo fueron de $2,73 \pm 0,29 \log_{10}$ ufc/g cuando se empleó la técnica estándar de siembra en medio agar violeta rojo neutro sales biliares (VRBA) (usado también en el presente trabajo) y de $3,38 \pm 0,77 \log_{10}$ ufc/g cuando se utilizó el método de filtración a través de membrana con rejilla hidrofóbica (Iso-Grid HGMF™; QA Lab, San Diego, California).

Los recuentos de **enterococos** observados en el presente trabajo ($2,63 \pm 0,80 \log_{10}$ ufc/g) fueron muy similares a los encontrados previamente en carne de pollo (Del Río *et al.*, 2007), situados en $2,88 \pm 0,48 \log_{10}$ ufc/g. Además de su papel como microorganismos indicadores, los enterococos son responsables de infecciones humanas, y muestran generalmente resistencia a múltiples antibióticos de importancia clínica (Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). En este sentido, son considerados microorganismos “centinela” de resistencia a antibióticos (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

Los recuentos medios de *Pseudomonas* encontrados en los preparados de carne de pollo analizados ($5,24 \pm 0,99 \log_{10}$ ufc/g) fueron superiores a los niveles observados con anterioridad en carne de pollo (entre $4,11 \pm 0,83 \log_{10}$ ufc/g y $4,70 \pm 0,92 \log_{10}$ ufc/g; Capita *et al.*, 2001; Del Río *et al.*, 2007). Los valores observados son inferiores a los que provocan cambios sensoriales (tales como variaciones de color, olor desagradable o formación de limosidad superficial), que oscilan entre 7 y $8 \log_{10}$ ufc/g (Gallo *et al.*, 1988).

En los últimos años se ha prestado una atención creciente a las **pseudomonas fluorescentes**, dada su gran capacidad de crecimiento a temperaturas de refrigeración y dada la circunstancia de que son las principales bacterias responsables de las etapas finales de deterioro de la carne (Capita *et al.*, 2001). Los recuentos medios de pseudomonas fluorescentes en el presente estudio ($3,13 \pm 0,91 \log_{10}$ ufc/g) fueron

inferiores a los observados por Gennari & Dragotto (1992), que afirmaron que los niveles normales de estos microorganismos en carne de aves de corral oscilan entre 4 y 6 log₁₀ ufc/g.

Con respecto al grupo de **mohos y levaduras**, este estudio puso de manifiesto niveles medios de 5,61 ± 0,96 log₁₀ ufc/g. Estos valores pueden considerarse altos en comparación con los resultados obtenidos con anterioridad para la carne de aves de corral: 2,99 ± 0,83 log₁₀ ufc/g (Capita *et al.*, 2001) y 3,96 ± 0,47 log₁₀ ufc/g (Del Río *et al.*, 2007).

Se aislaron un total de veinte cepas de ***S. aureus*** a partir de veinte muestras (una cepa por muestra) de carne picada, hamburguesas y salchichas. Esta prevalencia (66,7%) se sitúa dentro del rango de valores registrados en otros estudios de carne de aves de corral y sus productos, que son muy variables, oscilando entre el 3% (Osman *et al.*, 2016) y el 100% (Capita *et al.*, 2001; Del Río *et al.*, 2007).

Los recuentos medios de *S. aureus* encontrados en el presente trabajo, calculados considerando únicamente las muestras positivas, fueron 4,07 ± 0,80 log₁₀ ufc/g. Estos niveles se encuentran dentro de la amplia gama de valores observados por otros autores, que van desde menos de 3 a más de 5 log₁₀ ufc/g o cm² (Waldroup, 1996).

En España, el límite superior recomendado para los recuentos de *S. aureus* enterotoxinogénicos en carne de ave es de 2 log₁₀ ufc/g (Pascual-Anderson, 1992). En Francia existe, como recomendación, un plan de muestreo de tres categorías (CNERNA-CNRS, 1996), con $n = 5$, $c = 2$, $m = 10^3$ ufc/g y $M = 10^4$ ufc/g. Otro criterio microbiológico establece ausencia en 25 gramos de muestra (Wehr, 1982). Teniendo en cuenta todos estos criterios microbiológicos, los recuentos de *S. aureus* observados en la presente investigación han sido inaceptablemente elevados.

Determinación de la resistencia a antibióticos de las cepas de *S. aureus*

Se determinó la susceptibilidad de 20 cepas de *S. aureus* frente a un panel de veinte compuestos antimicrobianos de importancia clínica veterinaria y humana. El número de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes se muestra en la Figura I.1. En promedio, el número de resistencias por cepa fue de 6,35. La presencia de bacterias con múltiples resistencias a antibióticos de importancia clínica ha sido previamente observada en la carne de aves de corral por nuestro grupo de investigación (Alonso-Hernando *et al.*, 2012; Álvarez-Fernández *et al.*, 2012). Estos hallazgos

suponen un desafío crucial para la Salud Pública, ya que implican la invalidación de muchos antimicrobianos como opción terapéutica.

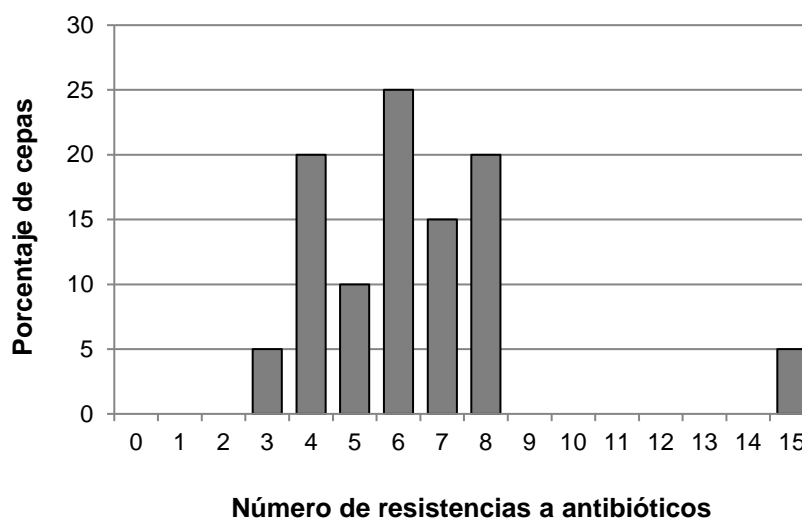
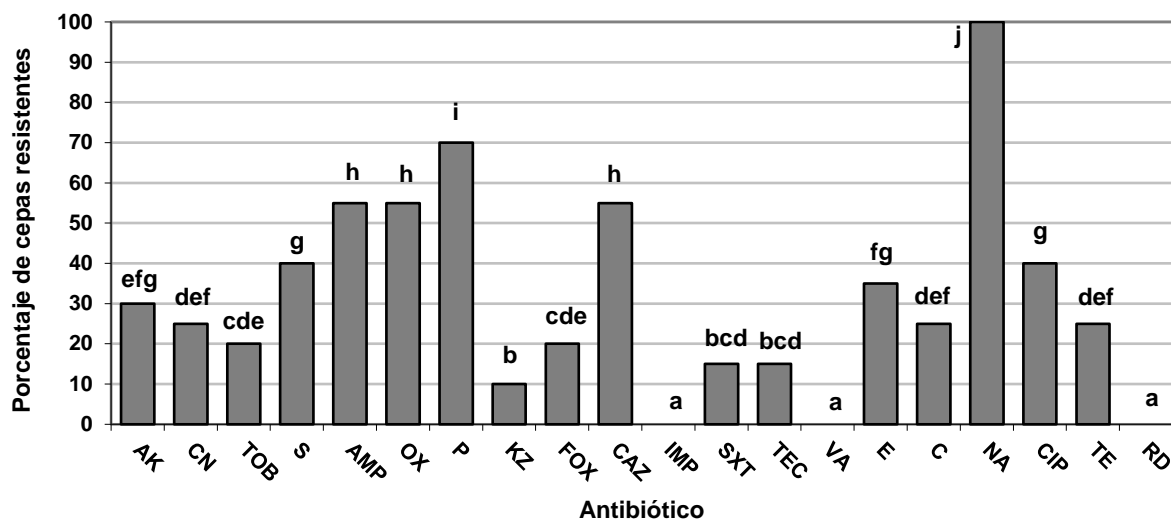


Figura I.1. Distribución, en base al número de antibióticos al que fueron resistentes, de las cepas de *S. aureus* aisladas de preparados de carne de ave.

La Figura I.2 muestra los porcentajes de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos examinados. Se observaron amplias diferencias entre compuestos, no detectándose ninguna resistencia frente a imipenem, vancomicina o rifampicina. Por categorías de antibióticos, los mayores niveles de resistencia se observaron frente a β -lactámicos, macrólidos, quinolonas y fluoroquinolonas. Más del 50% de las cepas fueron resistentes a la ampicilina (AMP), oxacilina (OX), penicilina G (P), ceftazidima (CAZ) y ácido nalidíxico (NA). Estos compuestos se clasifican, por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (*Office International des Epizooties*; OIE, 2015), como antibióticos de “importancia crítica” (AMP, OX y P) o de “importancia elevada” (NA) en medicina veterinaria. En la lista de la Organización Mundial de la Salud, AMP, P, CAZ y NA son considerados antibióticos de “importancia crítica” y OX se incluye en el listado de antibióticos de “importancia elevada”, en medicina humana (*World Health Organization*; WHO, 2012). Es también preocupante la relativamente alta prevalencia (más del 30% de las cepas) de resistencia a amikacina (AK), estreptomicina (S), eritromicina (E) y ciprofloxacina (CIP), que se clasifican como antimicrobianos de “importancia crítica” (WHO, 2012; OIE, 2015).



AK, amikacina (30 µg); CN, gentamicina (10 µg); TOB, tobramicina (10 µg); S, estreptomicina (10 µg); AMP, ampicilina (10 µg); OX, oxacilina (1 µg); P, penicilina G (10 unidades); KZ, cefazolina (30 µg); FOX, cefoxitina (30 µg); CAZ, ceftazidima (30 µg); IMP, imipenem (10 µg); SXT, sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg); TEC, teicoplanina (30 µg); VA, vancomicina (30 µg); E, eritromicina (15 µg); C, cloranfenicol (30 µg); NA, ácido nalidíxico (30 µg); CIP, ciprofloxacina (5 µg); TE, tetraciclina (30 µg); RD, rifampicina (5 µg). Las barras que comparten alguna letra no presentan diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$).

Figura I.2. Porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia a cada uno de los antibióticos examinados.

Otros investigadores han observado también elevados niveles de resistencia a antibióticos β -lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas y fluoroquinolonas en aislamientos de *S. aureus* procedentes de animales de abasto y alimentos de origen animal (Osman *et al.*, 2016). La elevada prevalencia de resistencia a estas familias de antibióticos es un resultado esperable, dado el amplio uso de dichas sustancias en medicina veterinaria (De Briyne *et al.*, 2014). Así, la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos (especialmente cuando son empleados incorrectamente a dosis subinhibitorias) ha sido identificada como la principal causa del marcado incremento de la prevalencia de resistencia que ha tenido lugar en las últimas décadas (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

Hay que señalar que en el presente trabajo se detectó resistencia a antibióticos no utilizados en medicina veterinaria en España. Por ejemplo, debido a los efectos tóxicos (carcinogenicidad y mutagenicidad) del cloranfenicol para los consumidores, hace más

de dos décadas que en la Unión Europea se prohibió el uso de este antibiótico en producción animal - Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo-. Los mecanismos de co-resistencia o resistencia cruzada podrían ser la causa de la resistencia observada para este compuesto, como se ha señalado con anterioridad (Capita & Alonso-Calleja, 2013). En este sentido, se ha indicado que el uso de un determinado antibiótico modifica los genes de resistencia en las comunidades de bacterias (resistoma) y que los efectos sobre este conjunto de genes pueden persistir durante décadas incluso en ausencia de cualquier contacto con dicho antibiótico (Sommer & Dantas, 2011). Smith *et al.* (2007) observaron que las exposiciones sucesivas a los antibióticos crean una resistencia que es estable en el tiempo y que las cepas resistentes pueden competir con aquellas que no lo son incluso en ausencia de presión selectiva. Se ha demostrado que tales contactos sucesivos pueden tener efectos acumulativos, de modo que con cada nueva aplicación de antimicrobianos se incrementa la frecuencia de cepas multirresistentes (Martins da Costa *et al.*, 2011).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Ruwaida, A. S., Sawaya, W. N., Dashti, B. H., Murard, M., Al-Othman, H. A. (1994). Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *Journal of Food Protection* **57**, 887-892.
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**, 37-41.
- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science* **62**, 45-50.
- 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., Díez-Vega, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. *Food Control* **30**, 227-234.
- Baird, R. M., Corry, J. E. J., Curtis, G. D. W. (1987). Pharmacopeia of culture media for food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* **5**, 221-222.
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**, 294-301.
- 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., 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**, 756-771.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M. C., Moreno, B. (2001). Microbiological quality of retail poultry carcasses in Spain. *Journal of Food Protection* **64**, 1961-1966.
- CLSI –*Clinical and Laboratory Standards Institute*- (2013). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals*, 4th ed. Approved standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- CNERNA-CNRS –*Centre National d'Études et Recommandations sur la Nutrition et l'Alimentation-Centre National de la Recherche Scientifique*- (1996). Critères microbiologiques, pp. 353-361. En: J. L. Jouve (ed.), *La qualité microbiologique des aliments*. Polytechnica, Paris.
- Cousin, M. A., Jay, J. M., Vasavada, P. C. (2001). Psychrotrophic microorganisms, pp. 159-166. En: Downes, F. P., Ito, K. (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Dainty, R. H., Mackey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* **73**, 103S-114S.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S. P. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *The Veterinary Record* **175** (13), 325.

- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., 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-ECDC –European Food Safety Authority-European Centre for Disease Prevention and Control- (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* **14**, 4634, 231 pp.
- El-Leithy, M. A., Rashad, F. M. (1989). Bacteriological studies on ground meat and its products. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **40**, 58-61.
- FAO –Food and Agriculture Organization of the United Nations- (2017). Food Balance Sheets, FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>. Fecha del último acceso: 17 de marzo de 2017.
- Gallo, L., Schmitt, R. E., Schmidt-Lorenz, Z. W. (1988). Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. I. Bacterial flora and growth during storage. *LWT – Food Science and Technology* **21**, 216-223.
- Gashe, B. A., Mpuchane, S. (2000). Prevalence of salmonellae on beef products at butcheries and their antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Science* **65**, 880-883.
- Gennari, M., Dragotto, F. (1992). A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *Journal of Applied Bacteriology* **72**, 281-288.
- Guerrero-Ramos, E., Molina-González, D., Blanco-Morán, S., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in meat preparations. *Journal of Food Protection* **79**, 748-756.
- ICMSF -International Commission on Microbiological Specifications for Foods- (1986). *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications. Vol. 2*. University of Toronto Press, Toronto.
- ICMSF -International Commission on Microbiological Specifications for Foods- (2011). *Microorganisms in foods 8. Use of data for assessing process control and product acceptance*. Springer, New York.
- IFST -Institute of Food Science and Technology- (1997). Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today* **11**, 137–176.
- Jay, J. M. (2002). A review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. *Journal of Food Protection* **65**, 1200-1206.
- Lancette, G. A., Tatini, S. R. (1992). *Staphylococcus aureus*, pp. 533-550. En: Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F. (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, Washington, D.C.
- Lerasle, M., Federighi, M., Simonin, H., Anthoine, V., Rezé, S., Chéret, R., Guillou, S. (2014). Combined use of modified atmosphere packaging and high pressure to extend the shelf-life of raw poultry sausage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **23**, 54-60.
- MAGRAMA –Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente- (2016). Informe del consumo de alimentación en España 2015, MAGRAMA. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf. Fecha del último acceso: 17 de marzo de 2017.
- 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.

- OIE –*Office International des Epizooties*- (2015). OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf. Fecha del último acceso: 17 de marzo de 2017.
- OJEU –*Official Journal of the European Union*- (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **L 338**, 1-26.
- Osman, K., Badr, J., Al-Maary, K. S., Moussa, I. M. I., Hessain, A. M., Girah, Z. M. S. A., Abo-Shama, U. H., Orabi, A., Saad, A. (2016). Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase-positive-and negative-*Staphylococcus* in chicken meat retailed to consumers. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1846.
- Palleroni, N. J. (1984). Genus *Pseudomonas*, pp. 141-199. En: Krieg, N. R., Holt, J. G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Pascual-Anderson, M. R. (1992). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Díaz de Santos, Madrid.
- Selvan, P., Nerendra Babu, R., Sureshkumar, S., Venkataramanujam, V. (2007). Microbial quality of retail meat products available in Chennai city. *American Journal of Food Technology* **2**, 55-59.
- Seok, K., Bohach, G. A. (2007). *Staphylococcus aureus*, pp. 493-518. En: Doyle, M. P., Beuchat, R. L. (eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd ed. ASM Press, Washington D.C.
- Smith, J. L., Drum, D. J. V., Dai, Y., Kim, J. M., Sánchez, S., Maurer, J. J., Hofacre, C. L., Lee, M. D. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1404-1414.
- Sommer, M. O. A., Dantas, G. (2011). Antibiotics and the resistant microbiome. *Current Opinion in Microbiology* **14**, 556–563.
- Waldroup, A. L. (1996). Contamination of raw poultry with pathogens. *World Poultry Science Journal* **52**, 7-25.
- Wehr, H. M. (1982). Attitudes and policies of governmental agencies on microbial criteria for foods. *Food Technology* **36**, 45-54.
- WHO –*World Health Organization*- (2012). WHO list of critically important antimicrobials. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Fecha del último acceso: 17 de marzo de 2017.

CAPÍTULO II

**Susceptibilidad a antibióticos de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS)
de origen alimentario: comparación del método clásico de difusión por disco y
un *test* miniaturizado disponible comercialmente**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) es un problema importante en el ámbito de la Salud Pública dada su capacidad para causar infecciones humanas severas, tanto en el entorno clínico como en la comunidad (Marigadas *et al.*, 2017). Otros estafilococos resistentes a la meticilina, tanto coagulasa-positivos como coagulasa-negativos (*methicillin-resistant staphylococci*, MRS; por ejemplo *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. xylosum*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* o *S. haemolyticus*) han adquirido relevancia en los últimos años al haber sido identificados como los agentes etiológicos de diversas infecciones oportunistas en poblaciones humanas, particularmente en individuos inmunodeprimidos (Koksál *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2014). Los animales de abasto y los alimentos de origen animal se consideran una posible fuente y una vía de transmisión de MRS a la comunidad, y durante años se han demostrado infecciones de origen alimentario causadas por estas bacterias (Buzón-Durán *et al.*, 2017). Por otro lado, las bacterias de los alimentos con resistencia a antibióticos suponen un reservorio de genes de resistencia, que pueden transferirse a otras bacterias más virulentas a lo largo de la cadena de producción de alimentos (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

El método convencional de difusión por disco es el más frecuentemente usado para estudiar la susceptibilidad a antibióticos de diferentes grupos microbianos, incluyendo *Staphylococcus* spp. Sin embargo, puesto que se trata de un método laborioso, en los últimos años se han comercializado diferentes sistemas, más rápidos y sencillos, para la determinación *in vitro* de la susceptibilidad a antimicrobianos. El kit comercial *Sensi Test Gram-positive* (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italia) es un sistema de 24 pocillos que contiene antibióticos deshidratados y que permite la obtención de resultados en 18-24 horas. En un estudio previo se ensayó el kit *Sensi Test Gram-negative* frente a cepas de *Escherichia coli* (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el sistema miniaturizado para bacterias Gram-positivas.

Los objetivos de este estudio han sido determinar los patrones de resistencia a antibióticos de cepas de MRS aisladas de preparados cárnicos y evaluar el sistema *Sensi Test Gram-positive* para determinar la resistencia a antibióticos de dichas cepas; para ello se compararon los resultados del método de difusión por disco y del test miniaturizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ensayaron un total de 30 cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (*methicillin-resistant staphylococci*, MRS), tanto coagulasa-positivas como coagulasa-negativas, previamente aisladas de preparados cárnicos (elaborados con carne de mamíferos o de aves) obtenidos en establecimientos de venta al público de la ciudad de León. Los aislamientos pertenecían a las especies *Staphylococcus aureus* (tres cepas), *S. cohnii* (una), *S. epidermidis* (siete), *S. haemolyticus* (una), *S. hominis* (tres), *S. lentus* (dos), *S. lugdunensis* (dos), *S. sciuri* (ocho) y *S. xylosus* (tres).

Se realizaron dos tipos de ensayos. En primer lugar, se determinó la susceptibilidad de las cepas de MRS frente a un panel de 11 antimicrobianos utilizando la técnica de difusión por disco (CLSI, 2013) en agar Mueller-Hinton (Oxoid Ltd. Hampshire, Reino Unido). Se emplearon los siguientes discos de antibióticos (Oxoid): gentamicina (CN; 10 µg), tobramicina (TOB; 10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30 µg), ampicilina-sulbactam (SAM; 20 µg), piperacilina (PRL; 100 µg), ceftazidima (CAZ; 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT; 25 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), eritromicina (E; 15 µg), fosfomicina (FOS; 50 µg) y rifampicina (RD; 5 µg). Tras la incubación (35 °C, 18-24 horas) se midieron los halos de inhibición, lo que permitió la clasificación de las cepas como sensibles, de susceptibilidad intermedia o resistentes, en base a los criterios del CLSI.

Asimismo, se determinó la susceptibilidad de los 30 aislamientos frente a los antimicrobianos señalados usando el método miniaturizado *Sensi Test Gram-positive* (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italia), en cuyo caso la interpretación de los resultados se basa en el color de los pocillos tras la incubación. Las cepas fueron clasificadas como susceptibles, de susceptibilidad intermedia, o resistentes. Para el control de calidad de los discos de antibióticos y del *test* miniaturizado se usó la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. La evaluación del sistema *Sensi Test Gram-positive* se realizó calculando su sensibilidad, especificidad, eficiencia y valores predictivos. Las definiciones y la forma de calcular estos parámetros se muestran en la Figura II.1. Puesto que la resistencia o susceptibilidad real de las cepas es desconocida, el método de cálculo asume que la técnica convencional de difusión por disco proporciona los resultados correctos. Adicionalmente, los dos métodos se compararon mediante el cálculo del coeficiente *kappa* (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013).

		Método de difusión por disco	
		+	-
Prueba miniaturizada	+	a	b
	-	c	d

a = verdadero positivo, resistencia a antibióticos detectada con ambos métodos (convencional y miniaturizado)
 b = falso positivo, resistencia a antibióticos detectada con el método miniaturizado pero no con el convencional
 c = falso negativo, resistencia a antibióticos detectada con el método convencional pero no con el miniaturizado
 d = verdadero negativo, resistencia a antibióticos no detectada con ninguno de los dos métodos

- Sensibilidad (capacidad para detectar resistencia a antibióticos) = $a/(a+c)$
- Especificidad (capacidad para detectar susceptibilidad a antibióticos) = $d/(b+d)$
- Eficiencia (probabilidad de que el resultado sea correcto) = $(a+d)/n$; $n=a+b+c+d$
- Valor predictivo:
 - de una prueba positiva (probabilidad de que un resultado positivo sea correcto) = $a/(a+b)$
 - de una prueba negativa (probabilidad de que un resultado negativo sea correcto) = $d/(c+d)$
- Coeficiente *kappa* = $(\text{eficiencia} - X)/(1-X)$

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

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resistencia a antibióticos

Se ensayaron, frente a un panel de 11 antimicrobianos de importancia en medicina humana y en veterinaria, un total de 30 cepas de MRS previamente aisladas de preparados cárnicos. La Tabla II.1 muestra los porcentajes de resistencia a antibióticos (método de difusión por disco) de cada una de las especies ensayadas. Se observaron elevados porcentajes de resistencia frente a eritromicina (76,7% de las cepas), tobramicina (66,7%), ceftazidima (66,7%), ciprofloxacina (56,7%) y fosfomicina (53,3%). Estos son hallazgos preocupantes ya que los cinco compuestos señalados se consideran como agentes antimicrobianos de “importancia crítica” en medicina humana, según la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*; WHO, 2011). En la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (*Office International des Epizooties*; OIE, 2015), la eritromicina, la tobramicina y la ciprofloxacina se consideran de “importancia crítica”, y la fosfomicina de “importancia elevada”, en veterinaria. Cabe señalar también la alta prevalencia de resistencia (más del 30% de las cepas) observada frente a piperacilina, gentamicina y rifampicina, que están clasificados como antimicrobianos de “importancia crítica” en medicina humana (WHO, 2011).

El alto porcentaje de cepas con resistencia a macrólidos, aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas observado en la presente investigación es un resultado coincidente con los hallazgos de otros autores al estudiar cepas de *Staphylococcus* spp. (incluyendo MRS) de alimentos de origen animal (Huber *et al.*, 2011; Hammad *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2015; Igbinosa *et al.*, 2016; Osman *et al.*, 2016). La elevada prevalencia de resistencia a estas clases de antimicrobianos es, muy probablemente, la consecuencia del empleo frecuente de estos compuestos en producción animal, como ha sido previamente sugerido (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

La Tabla II.2 muestra los diferentes fenotipos de resistencia a antibióticos de las 30 cepas ensayadas, obtenidos empleando el método convencional de difusión por disco. Se observaron un total de 22 patrones diferentes de resistencia a antibióticos. Un grupo de expertos internacionales que forman parte de la iniciativa conjunta del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) y el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los EE.UU. (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) ha proporcionado una definición estándar de los fenotipos de “multiresistencia” (*multidrug-*

resistant, MDR), “resistencia de espectro extendido” (*extensively drug-resistant*, XDR) y “panresistencia” (*pandrug-resistant*, PDR) en las bacterias de interés en Salud Pública. El fenotipo MDR se define como no susceptibilidad adquirida a al menos un antibiótico en tres o más categorías de antimicrobianos (debiendo aplicarse uno o más de ellos). El fenotipo XDR se define como ausencia de susceptibilidad a al menos un agente antimicrobiano de todas las categorías de antimicrobianos, admitiéndose un máximo de dos excepciones. Finalmente, el fenotipo PDR se refiere a ausencia de susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012). Este criterio ha sido utilizado para la caracterización del perfil de resistencia a antibióticos de las cepas ensayadas en el presente estudio.

Cinco cepas (16,7%) fueron susceptibles a todos los antibióticos ensayados (pansusceptibles), dos cepas (6,7%) fueron resistentes a un antibiótico, dos cepas (6,7%) mostraron resistencia a dos antibióticos, cuatro cepas (13,3%) presentaron un fenotipo de multi-resistencia (MDR) y 16 aislamientos (53,3%) presentaron un fenotipo de resistencia de espectro extendido (XDR). Todas las cepas de *S. sciuri* y *S. xylosus* se clasificaron como XDR. Los aislamientos adscritos a los fenotipos MDR y XDR mostraron resistencia a tres (una cepa; 3,3%), cuatro (dos cepas; 6,7%), cinco (tres cepas; 10,0%), seis (tres cepas; 10,0%), siete (siete cepas; 23,3%), ocho (cuatro cepas; 13,3%) o nueve (una cepa; 3,3%) compuestos antimicrobianos. Las numerosas resistencias observadas en las cepas de MRS son un resultado coincidente con estudios de otros autores, que han encontrado aislamientos de estafilococos resistentes y multi-resistentes en leche cruda, carne cruda, pescado crudo o productos cárnicos fermentados (Huber *et al.*, 2011; Hammad *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2015). Considerando las limitadas opciones existentes en el tratamiento de las infecciones causadas por estafilococos, es preocupante el hecho de que cepas de MRS con resistencia a un amplio espectro de antibióticos puedan ser introducidas en la comunidad a través de la cadena alimentaria, en este caso vehiculadas en preparados cárnicos (Osman *et al.*, 2016).

Se observó un número medio de 4,67 resistencias por aislamiento. Considerando separadamente cada especie, los valores fueron 4,33 (*S. aureus*), 5,00 (*S. cohnii*), 1,71 (*S. epidermidis*), 7,00 (*S. haemolyticus*), 3,00 (*S. hominis*), 5,50 (*S. lentus*), 1,50 (*S. lugdunensis*), 7,25 (*S. sciuri*) y 7,33 (*S. xylosus*).

Tabla II.1. Prevalencia de resistencia a antimicrobianos (%) en 30 cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) de origen alimentario.

Antibiótico	<i>S. aureus</i> (n=3)	<i>S. cohnii</i> (n=1)	<i>S. epidermidis</i> (n=7)	<i>S. haemolyticus</i> (n=1)	<i>S. hominis</i> (n=3)	<i>S. lentus</i> (n=2)	<i>S. lugdunensis</i> (n=2)	<i>S. sciuri</i> (n=8)	<i>S. xyloso</i> (n=3)	Todas las cepas (n=30)
CN	33,3	0,0	0,0	100	33,3	50,0	0,0	62,5	66,7	36,7
TOB	33,3	100	28,6	100	66,7	100	0,0	100	100	66,7
AMC	33,3	0,0	0,0	100	0,0	0,0	0,0	12,5	33,3	13,3
SAM	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3
PRL	66,6	0,0	28,6	100	0,0	0,0	0,0	62,5	66,7	40,0
CAZ	66,7	100	28,6	100	0,0	100	50,0	100	100	66,7
SXT	33,3	0,0	28,6	0,0	33,3	50,0	50,0	0,0	0,0	20,0
CIP	66,7	100	0,0	0,0	33,3	100	0,0	100	100	56,7
E	66,7	100	28,6	100	100	100	50,0	100	100	76,7
FOS	33,3	100	14,3	100	33,3	50,0	0,0	87,5	100	53,3
RD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100	66,7	33,3

CN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; SAM, ampicilina-sulbactam; PRL, piperacilina; CAZ, ceftazidima; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; E, eritromicina; FOS, fosfomicina; RD, rifampicina.

Tabla II.2. Patrones de resistencia a antibióticos en cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) de origen alimentario.

Especie de MRS / fenotipo de resistencia a antibióticos	Número de aislamientos con dicho fenotipo
<i>S. aureus</i> (n = 3)	
CN-TOB-PRL-CAZ-SXT-CIP-E-FOS	1
AMC-PRL-CAZ-CIP-E	1
Pansusceptible	1
<i>S. cohnii</i> (n = 1)	
TOB-CAZ-CIP-E-FOS	1
<i>S. epidermidis</i> (n = 7)	
TOB-CAZ-SXT-E-FOS	1
TOB-CAZ-SXT-E	1
SAM-PRL	1
PRL	1
Pansusceptible	3
<i>S. haemolyticus</i> (n = 1)	
CN-TOB-AMC-PRL-CAZ-E-FOS	1
<i>S. hominis</i> (n = 3)	
CN-TOB-SXT-CIP-E-FOS	1
TOB-E	1
E	1
<i>S. lentus</i> (n = 2)	
CN-TOB-CAZ-SXT-CIP-E-FOS	1
TOB-CAZ-CIP-E	1
<i>S. lugdunensis</i> (n = 2)	
CAZ-SXT-E	1
Pansusceptible	1
<i>S. sciuri</i> (n = 8)	
CN-TOB-PRL-CAZ-CIP-E-FOS-RD	3
CN-TOB-AMC-CAZ-CIP-E- RD	1
CN-TOB-CAZ-CIP-E-FOS-RD	1
TOB-PRL-CAZ-CIP-E-FOS-RD	2
TOB-CAZ-CIP-E-FOS-RD	1
<i>S. xylosus</i> (n = 3)	
CN-TOB-AMC-PRL-CAZ- CIP-E-FOS-RD	1
CN-TOB-CAZ-CIP-E-FOS-RD	1
TOB-PRL-CAZ-CIP-E-FOS	1

Para interpretación, ver Tabla II.1.

Comparación de métodos para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos de MRS

Los sistemas miniaturizados comercialmente disponibles para realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son muy adecuados para el trabajo rutinario de laboratorio. Debido a la importancia de los estafilococos resistentes a la meticilina como causa de infecciones en seres humanos (Buzón-Durán *et al.*, 2017), son altamente deseables sistemas fiables para determinar en estas cepas los patrones de resistencia a antibióticos. El presente trabajo representa el primer estudio comparativo entre el método convencional de difusión por disco y el sistema miniaturizado *Sensi Test Gram-positive* para determinar los patrones de resistencia a antibióticos de estafilococos aislados de los productos alimenticios.

Se analizaron 30 cepas de MRS frente a 11 antimicrobianos utilizando tanto el método de ensayo convencional como el miniaturizado. La Tabla II.3 muestra la sensibilidad, especificidad y eficiencia del sistema *Sensi Test Gram-positive*, su valor predictivo para una prueba positiva y una prueba negativa, respectivamente, y el cálculo del coeficiente *kappa* (concordancia entre ambos métodos). Debido a que no se conocía el estado real de las cepas (resistentes o susceptibles), se empleó el método convencional de difusión por disco como método de referencia.

La sensibilidad media (detección de aislamientos resistentes) del sistema *Sensi Test Gram-positive* fue del 98,44%. Se observó una sensibilidad del 100% para todos los compuestos excepto TOB (95,00%), CIP (94,12%) y FOS (93,75%). La especificidad media (detección de aislamientos susceptibles) fue del 69,64%. La capacidad de detectar la susceptibilidad a antibióticos de la prueba miniaturizada fue del 100% para SAM, CIP y RD. Se observó una especificidad ligeramente inferior para PRL (88,89%), E y FOS (85,71%). Finalmente, con la prueba miniaturizada se observaron valores de especificidad bajos ($\leq 50\%$) para TOB, AMC y CAZ.

La eficiencia media del *test* miniaturizado fue del 83,33%, observándose valores iguales o superiores al 50% para todos los antibióticos. Los valores de mayor eficiencia ($\geq 90\%$) se observaron para SAM, PRL, CIP, E, FOS y RD. El valor predictivo para una prueba positiva osciló entre el 21,05% (AMC) y el 100% (SAM, CIP y RD). Los valores

predictivos para una prueba negativa fueron altos ($\geq 90\%$) para todos los antimicrobianos, con la excepción de TOB (75,00%).

Tabla II.3. Evaluación del sistema miniaturizado *Sensi Test Gram-positive* para determinar la susceptibilidad a antibióticos de cepas de estafilococos resistentes a la metilina (MRS) de origen alimentario.

ANTIMICROBIANO	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Eficiencia (%)	Valor predictivo (%)		Coeficiente <i>kappa</i>
				prueba positiva	prueba negativa	
CN	100	52,63	70,00	55,00	100	0,45
TOB	95,00	30,00	73,33	73,08	75,00	0,29
AMC	100	42,31	50,00	21,05	100	0,16
SAM	100	100	100	100	100	1,00
PRL	100	88,89	93,33	85,71	100	0,90
CAZ	100	10,00	70,00	68,97	100	0,13
SXT	100	70,83	76,67	46,15	100	0,49
CIP	94,12	100	96,67	100	92,86	0,93
E	100	85,71	96,67	95,83	100	0,90
FOS	93,75	85,71	90,00	88,24	92,31	0,80
RD	100	100	100	100	100	1,00
Todos los antimicrobianos	98,44	69,64	83,33	75,82	96,38	0,64

Para interpretación, ver la Tabla II.1 y la Figura II.1.

Por último, los valores del coeficiente *kappa* oscilaron entre 0,13 (CAZ) y 1,00 (SAM, RD), con un promedio de 0,64. Una concordancia perfecta entre ambos métodos arrojaría un valor *kappa* de 1, mientras que un valor *kappa* de 0 indicaría la inexistencia de concordancia, o una concordancia que sólo podría explicarse por azar. El coeficiente *kappa* es un parámetro útil cuando se compara una nueva prueba con una prueba estándar si no se dispone de información sobre la sensibilidad y especificidad de la prueba estándar (Capita *et al.*, 2001). De acuerdo con las escalas comúnmente aceptadas (Landis & Koch, 1977), el método convencional de difusión por disco en

placas de agar Mueller-Hinton y el método comercializado *Sensi Test Gram-positive* mostraron una concordancia casi perfecta ($kappa > 0,80$) en la detección de resistencia para SAM (índice $kappa$ de 1,00), PRL (0,90), CIP (0,93), E (0,90) y RD (1,00). La concordancia fue sustancial ($kappa$ de 0,61 a 0,80) para FOS. Para el resto de antimicrobianos se encontró un grado de concordancia moderado ($kappa$ de 0,41 a 0,60; CN y SXT), medio ($kappa$ de 0,21 a 0,40; TOB) o reducido ($kappa$ de 0,01 a 0,20; AMC y CAZ). De acuerdo con esta escala, se observó una concordancia media sustancial entre los dos métodos ensayados (valor $kappa$ de 0,64).

La mayor parte de las discrepancias entre los dos métodos se debieron a aislamientos susceptibles según el método de difusión por disco, pero resistentes según la prueba miniaturizada (falsos positivos). Esto ocurrió para la CN (nueve cepas con resistencia detectada usando el método miniaturizado de 19 cepas sensibles según el método de difusión por disco; 47,4%), TOB (siete de 10; 70,0%), AMC (15 de 26; 57,7%), PRL (dos de 18; 11,1%), CAZ (nueve de 10; 90,0%), E (una de siete; 14,3%), FOS (dos de 14; 14,3%) y SXT (siete de 24; 29,2%). No se detectaron falsos positivos para SAM, CIP o RD. Por otro lado, se detectaron cepas falsas negativas (resistencia detectada utilizando el método convencional, pero no el miniaturizado) sólo para TOB (una cepa sin resistencia detectada utilizando el método miniaturizado de 20 cepas resistentes según el método de difusión en disco; 5,0%), CIP (una de 17; 5,9%) y FOS (una de 16; 6,3%). Por lo tanto, el método comercial subestima mínimamente la resistencia a los antimicrobianos debido a su muy alta sensibilidad. Teniendo en cuenta que a la hora de determinar el patrón de resistencia a antibióticos de una cepa bacteriana es más importante detectar su resistencia que su susceptibilidad (Luber *et al.*, 2003), los resultados del presente estudio sugieren que el método comercializado *Sensi Test Gram-positive* puede ser útil para predecir la resistencia a varios antimicrobianos en cepas de MRS procedentes de preparados cárnicos. Estos hallazgos no coinciden con los obtenidos previamente con el sistema *Sensi Test Gram-negative* (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013), en los que se demostró una sensibilidad media relativamente baja (71,52%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díez-Vega, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: a comparison of agar disc diffusion and Sensi-Test Gram-negative methods. *Food Control* **30**, 227-234.
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* **27** (4), 870-926.
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**, 294-301.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53** (1), 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **65** (1-2), 75-82.
- CLSI –Clinical and Laboratory Standards Institute- (2013). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals*, 4th ed. Approved standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Hammad, A. M., Watanabe, W., Fujii, T., Shimamoto, T. (2012). Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *International Journal of Food Microbiology* **156**, 286-289.
- Huber, H., Ziegler, D., Pflüger, V., Vogel, G., Zweifel, C., Stephan, R. (2011). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Veterinary Research* **7**, 6.
- Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Akporehe, L. U., Oviasogie, F. E., Igbinosa, O. O. (2016). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in raw meat samples intended for human consumption in Benin city, Nigeria: Implications for Public Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **13**, 949-959.
- Koksal, E., Yasar, H., Samasti, M. (2009). Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiology Research* **164** (4), 404-410.
- Landis, J. R., Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33** (1), 159-174.
- 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), 1062-1068.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology Infection* **18**, 268–281.
- Marigadas, V., Kuttanapilly, T. C. J., Lalitha, V. (2017). Tracing contamination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) into seafood marketing chain by staphylococcal protein A typing. *Food Control* **78**, 43-47.

- Nunes, R. S. C., Del Aguila, E. M., Paschoalin, V. M. F. (2015). Safety evaluation of the coagulase-negative staphylococci microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. *BioMed Research International* **2015**, 483548.
- OIE -Office International des Epizooties- (2015). OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf. Fecha del ultimo acceso: 11 de marzo de 2017.
- Osman, K., Badr, J., Al-Maary, K. S., Moussa, I. M. I., Hessain, A. M., Girah, Z. M. S. A., Abo-Shama, U. H., Orabi, A., Saad, A. (2016). Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase-positive-and negative-staphylococcus in chicken meat retailed to consumers. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1846.
- WHO -World Health Organization- (2011). WHO list of critically important antimicrobials. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Fecha del ultimo acceso: 11 de marzo de 2017.

CAPÍTULO III

Efecto de concentraciones subinhibitorias de biocidas sobre la arquitectura y viabilidad de los *biofilms* producidos por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA)

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En 1961 se detectó por primera vez el microorganismo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) y, desde entonces, se ha convertido en una causa relativamente frecuente de infecciones nosocomiales (Traversa *et al.*, 2015), incluyendo septicemias e infecciones de diferentes tejidos, fundamentalmente pulmones y piel, asociadas a elevadas tasas de letalidad (Normanno *et al.*, 2015). MRSA es el agente etiológico de aproximadamente el 44% de las infecciones hospitalarias (en torno a 171.000 cada año) en la Unión Europea, provocando unas 5.400 muertes adicionales atribuibles y unos costes hospitalarios extra estimados en 380 millones de euros anuales (Köck *et al.*, 2010).

Además de las infecciones por MRSA adquiridas en hospitales, en los últimos años se han descrito infecciones severas por este microorganismo en la comunidad, en personas que no exhiben los factores de riesgo típicos asociados a la infección nosocomial (Otter & French, 2010). Según datos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*; EFSA, 2009), los animales de abasto y los productos de origen animal son considerados como una posible fuente y vía de transmisión de MRSA en la comunidad (MRSA asociado al ganado), y esta bacteria ha sido aislada ocasionalmente de alimentos de origen animal (Kraushaar & Fetsch, 2014; Normanno *et al.*, 2015; Oniuc *et al.*, 2015). Además, durante años, estudios genéticos y epidemiológicos han demostrado la existencia de infecciones por MRSA de origen alimentario (Kluytmans *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2016).

Entre sus muchos factores de virulencia, MRSA posee la capacidad para formar biopelículas o *biofilms* (Raggi *et al.*, 2013). Los *biofilms* consisten, básicamente, en comunidades microbianas complejas rodeadas por una matriz extracelular producida por ellas mismas, que se encuentran unidas a superficies vivas o inertes, incluyendo productos alimenticios, equipos de procesamiento de alimentos y dispositivos médicos (Díez-García *et al.*, 2012). Las células bacterianas en los *biofilms* están protegidas de diferentes condiciones de estrés ambiental (por ejemplo, antimicrobianos, limitación de nutrientes o estrés osmótico), hecho que mejora la persistencia de los microorganismos en las diferentes superficies (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

Los *biofilms* presentes en superficies de contacto con los alimentos son una fuente potencial de contaminación de los productos alimenticios, que puede conducir al deterioro o a la transmisión de patógenos alimentarios. En el ambiente hospitalario, los

biofilms se han convertido en una causa de preocupación debido a su papel potencial en infecciones relacionadas con dispositivos médicos, especialmente catéteres e implantes (Fernández-Baraz *et al.*, 2012). Para combatir los *biofilms*, se han usado ampliamente diferentes compuestos biocidas, tanto en entornos alimentarios como clínicos. Los compuestos de amonio cuaternario, como el cloruro de benzalconio (CB), son tensioactivos catiónicos empleados en fórmulas desinfectantes y antisépticas utilizadas en el sistema sanitario, en agricultura y en la industria (Gadea *et al.*, 2017). El fosfato trisódico (FTS) se usa como conservante de los alimentos, descontaminante de carne de mamíferos y aves y como agente de limpieza (Capita *et al.*, 2002). Por su parte, el hipoclorito sódico (HIP) es uno de los compuestos más ampliamente usados en los procesos de limpieza y desinfección, tanto en el sistema sanitario como en las industrias alimentarias (Dynes *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2014).

Un uso inapropiado de los biocidas, por ejemplo, mediante el empleo de concentraciones incorrectas, almacenamiento inadecuado o presencia de residuos excesivos de materia orgánica (capaces de inactivar varias sustancias biocidas, como muchos compuestos clorados) pueden proporcionar una exposición subletal, y esto representa un riesgo real para el desarrollo de adaptación a biocidas (Dynes *et al.*, 2009). Un aumento de la tolerancia a los biocidas es un problema importante para la Salud Pública, y algunos estudios recientes demuestran que la exposición a concentraciones subletales de biocidas favorece la formación de *biofilms* por *Staphylococcus* (Houari & Di Martino, 2007; Redelman *et al.*, 2012; Kumar & Ting, 2013; Lee *et al.*, 2014; Luther *et al.*, 2015) y otras bacterias patógenas (Capita *et al.*, 2014; Lombardo Bedran *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios con CB, FTS e HIP frente a MRSA en este contexto.

La microscopía láser confocal de barrido (CLSM) es una técnica de referencia para el estudio *in vivo* e *in vitro* de los *biofilms*. Existen pocas publicaciones sobre la estructura tridimensional de *biofilms* de MRSA estudiada por medio de CLSM, y los existentes han proporcionado medidas cuantitativas globales de la biomasa del *biofilm* (Ebrahimi *et al.*, 2015). Para diferenciar entre células bacterianas vivas y muertas se pueden usar dos colorantes fluorescentes, SYTO9 y yoduro de propidio (YP). El YP es un colorante fluorescente rojo que penetra sólo en aquellas células que tienen las membranas rotas y generalmente es incapaz de entrar en las células viables. El SYTO9 es un colorante fluorescente verde que tiñe tanto las células vivas como las células muertas. La señal fluorescente del SYTO9 es más fuerte cuando se encuentra unido a

los ácidos nucleicos y presenta una señal de fluorescencia intrínseca baja cuando no se encuentra unido a dichas estructuras. Cuando ambos colorantes están presentes, el YP exhibe una afinidad más fuerte por los ácidos nucleicos que el SYTO9, por lo tanto, el SYTO9 es desplazado por el YP. Así, las células viables emiten una fluorescencia verde, mientras que las células muertas emiten una fluorescencia roja (Lee *et al.*, 2014).

En estudios previos en los que se han estudiado *biofilms* bacterianos por medio de microscopía láser confocal, se han proporcionado análisis cualitativos de viabilidad bacteriana, particularmente tras la exposición a antimicrobianos (Rello *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014). Sin embargo, es muy reducido el número de trabajos que han aplicado análisis cuantitativos a la viabilidad bacteriana en los *biofilms* (Cairns *et al.*, 2011), y hasta el momento no se ha publicado ninguna evaluación cuantitativa de la viabilidad de MRSA usando CLSM.

El presente estudio se llevó a cabo para investigar, por medio de microscopía láser confocal de barrido (CLSM), los efectos de concentraciones por debajo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de tres biocidas (cloruro de benzalconio, fosfato trisódico e hipoclorito sódico) en los parámetros estructurales (biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, rugosidad y altura máxima) de los *biofilms* producidos por una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) de origen alimentario. Adicionalmente, se realizó un análisis cuantitativo de la viabilidad bacteriana en los *biofilms*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa y condiciones del cultivo

Se empleó una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA 48a) aislada previamente de una hamburguesa de carne de ave. La cepa mostró resistencia (método de difusión por disco; CLSI, 2013) a amikacina (AK; 30 µg), gentamicina (CN; 10 µg), tobramicina (TOB; 10 µg), estreptomina (S; 10 µg), ampicilina (AMP; 10 µg), ampicilina-sulbactam (SAM; 20 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30 µg), oxacilina (OX; 1 µg), penicilina G (P; 10 unidades), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT; 25 µg), eritromicina (E; 15 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), ácido nalidíxico (NA; 30 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), fosfomicina (FOS; 50 µg) y vancomicina (VA; 30 µg). La cepa se criopreservó a -80 °C en caldo triptona de soja (*tryptone soya broth*, TSB, Oxoid Ltd., Hampsire, Reino Unido) con un 20% (v/v) de glicerol. Previamente a los experimentos, se realizaron dos subcultivos, en TSB a 37 °C, de las células criopreservadas. Los cultivos se conservaron a 4 °C ± 1 °C en placas de agar triptona de soja (*tryptone soye agar*, TSA, Oxoid) y se subcultivaron con una periodicidad mensual.

Biocidas

Se ensayaron tres compuestos: cloruro de benzalconio (CB, Fluka, Deisenhofen, Alemania), fosfato trisódico (FTS, Merck, Darmstadt, Alemania) e hipoclorito sódico (HIP, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Se prepararon soluciones estériles con agua destilada inmediatamente antes de cada experimento.

Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias

Para determinar los valores de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) se empleó el método de dilución en caldo de acuerdo con las pautas del CLSI (2013). Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Se inocularon cinco colonias de MRSA 48a (que se tomaron de placas de TSA) en caldo Mueller-Hinton (MH, Oxoid) y se incubaron a 37 °C. Experimentos previos realizados pusieron de manifiesto que en estas condiciones se obtenían cultivos de aproximadamente 5×10^8 ufc/ml. Se realizaron 3 diluciones en caldo Mueller-Hinton. Los pocillos se rellenaron con 20 µl de solución del biocida (se utilizó un rango de concentraciones para cada biocida) y 180 µl de la tercera dilución del cultivo bacteriano, con el fin de obtener en el pocillo una concentración final de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa. Las placas de microtítulo se incubaron a 37 °C en el equipo turbidimétrico

automatizado Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Se incluyeron en el experimento controles positivos (200 μ l del inóculo a concentración 5×10^5 ufc/ml) y controles negativos (180 μ l de caldo MH + 20 μ l de la solución del biocida). Los experimentos se repitieron cinco veces en días separados. La CMI se estableció como la concentración más baja del biocida necesaria para evitar el crecimiento tras 48h de incubación (Capita *et al.*, 2014).

Exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas

El procedimiento fue similar al descrito para la determinación de las CMIs. La concentración de partida fue la mitad de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI/2). Cuando se observó crecimiento, se trasvasaron 20 μ l de la suspensión al siguiente pocillo, que contenía 160 μ l de caldo MH y 20 μ l de la solución del biocida. Después de la transferencia, cada pocillo contenía una concentración 1,5 veces más alta que el pocillo previo. Este procedimiento se realizó hasta que tras 72 h de incubación a 37 °C no se observó crecimiento. La suspensión en el último pocillo en el que hubo crecimiento se sembró en placas de TSA con biocida (se añadió al TSA la mitad de la concentración máxima de biocida que permitió el crecimiento microbiano). Las células no expuestas se cultivaron en TSB y posteriormente se sembraron en placas de TSA sin biocida. Tras la incubación a 37 °C durante 48 h, las placas de agar se mantuvieron a una temperatura de 4 ± 1 °C durante un tiempo máximo de una semana. Todas las células se ensayaron a la vez después del mismo número de días de almacenamiento en placas de agar.

Estabilidad de los cultivos adaptados

La estabilidad de la tolerancia adaptativa se determinó para cada compuesto cultivando repetidamente la cepa MRSA 48a en caldo no selectivo (TSB) sin biocidas. Este procedimiento se repitió cada 24 h durante 10 días. Al cabo de 10 días, se determinó la capacidad de las cepas para crecer en presencia de la concentración máxima de biocidas que permitía el crecimiento microbiano inmediatamente después de la exposición a concentraciones crecientes de los compuestos.

Estudio de los *biofilms*

El análisis de la formación y la estructura de los *biofilms* se llevó a cabo usando un método previamente descrito (Capita *et al.*, 2014) con algunas modificaciones. De forma resumida, los cultivos se incubaron en TSB a 37 °C durante 18 h y posteriormente se realizaron dos diluciones en el mismo caldo de cultivo para obtener una concentración

de aproximadamente 10^6 ufc/ml. Se utilizó TSB con biocida (CMI/2) para el crecimiento y diluciones de las células previamente expuestas, mientras que en el caso de células no expuestas se utilizó TSB sin biocidas. Se añadió un volumen de 250 μ l a los pocillos de placas de microtítulo de 96 pocillos con fondo de vidrio estériles Matrix® (Thermo Scientific, New Hampshire, EE.UU.), que poseen el fondo plano, una elevada calidad óptica y una baja fluorescencia de fondo, lo cual permite obtener imágenes de alta resolución. Después de 60 minutos de adhesión a 37 °C, los pocillos se lavaron con NaCl 150 mM para eliminar cualquier bacteria no adherida, antes de rellenarse con 250 μ l de caldo de cultivo. Se añadió TSB con biocidas (CMI/2) y sin biocidas a todos los grupos de pocillos (que contenían células no expuestas y células previamente expuestas a CB, FTS o HIP). Así, se ensayaron un total de 16 condiciones diferentes. Después de la incubación de la placa durante 24 h a 37 °C, los pocillos se lavaron con NaCl 150 mM. Se añadieron a cada pocillo volúmenes de 250 μ l de una solución compuesta por 2,5 μ l de una mezcla 1:1 de colorantes fluorescentes SYTO9 (*stock* de 3,34 mM en DMSO) y yoduro de propidio (YP, *stock* de 20 mM en DMSO) del kit de viabilidad LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y 1.000 μ l de TSB. Posteriormente, la placa se incubó en oscuridad a 30 °C durante 20 minutos para permitir la unión de los colorantes al ADN. En la observación al microscopio (CLSM), el SYTO9 emite una fluorescencia verde y se utiliza para identificar los microorganismos vivos con membranas intactas, mientras que el YP emite fluorescencia roja y tiñe las bacterias muertas con membranas dañadas. Por lo tanto, las células muertas y las viables pueden identificarse simultáneamente.

La adquisición de las imágenes por medio de microscopía láser confocal de barrido (CLSM) se realizó usando un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-U con el programa EZ-C13.60 (Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE.UU.). Se observaron los *biofilms* con la lente de cuarenta aumentos (40 \times). La fluorescencia se detectó mediante excitación a 488 nm (láser de argón) y las emisiones se recogieron con un filtro 590/50 (SYTO9) o 650LP (yoduro de propidio).

Por cada *biofilm* formado, se obtuvieron tres imágenes (512 \times 512 píxeles, lo que corresponde a 119 \times 119 μ m) en 3 zonas de cada pocillo seleccionadas aleatoriamente. Se realizaron un total de 3 experimentos independientes (en días diferentes) para cada condición. Así, se obtuvieron un total de 144 imágenes. Para el análisis de las imágenes, se reconstruyeron las proyecciones tridimensionales de las estructuras de los

biofilms usando la función Easy 3D del programa informático Imaris 7.5 (Bitplane, Zurich, Suiza).

Para calcular los parámetros estructurales de los *biofilms*, como su biovolumen, porcentaje de superficie cubierta y rugosidad, se utilizó el programa informático BioRCA 1.4 (entorno *Lazarus*), desarrollado por nuestro Grupo de Investigación. Este programa permite la cuantificación de la población total de *biofilm* (incluyendo bacterias vivas y muertas), así como de las subpoblaciones independientes representadas por fluorescencia verde (células vivas) o roja (células inactivadas). El biovolumen representa el volumen total de células (μm^3) presentes en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) y proporciona una estimación de la cantidad de biomasa de la biopelícula formada. El porcentaje de superficie cubierta (%) refleja la eficiencia de la formación del sustrato por la comunidad bacteriana. La rugosidad proporciona una medida de la variación en el grosor del *biofilm* en diferentes puntos y se utilizó como un indicador de la heterogeneidad del *biofilm*. Finalmente, la altura máxima (μm) de los *biofilms* se determinó a partir del número de secciones ópticas de un μm en el eje z.

Análisis estadístico

Los parámetros estructurales cuantitativos de los *biofilms* se compararon usando técnicas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La separación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. Para el procesado de datos se utilizó el programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

RESULTADOS

Adaptación de MRSA a los biocidas

Los valores de la CMI del CB, el FTS y el HIP para las células de MRSA antes de la exposición a los biocidas fueron de 2,0 µg/ml (CB), 28,0 mg/ml (FTS) y 5,0 mg/ml (HIP). Después de varios pases a través de concentraciones crecientes subinhibitorias de los compuestos, la concentración máxima de biocidas que permitió el crecimiento bacteriano fue de 5,1 µg/ml (CB), 21,0 mg/ml (FTS) y 8,4 mg/ml (HIP). La tolerancia adaptativa al HIP fue estable después de cultivar en caldo no selectivo sin biocidas (la cepa se subcultivó a través de TSB sin biocida cada 24 horas durante 10 días). Por otro lado, en ausencia de presión selectiva, las células que se habían adaptado al CB volvieron a su sensibilidad previa a la adaptación. No se observó adaptación al FTS.

Formación de *biofilm*

La cepa MRSA 48a formó *biofilms* de forma eficaz en las condiciones experimentales ensayadas. Para determinar el efecto de las concentraciones subinhibitorias de CB, FTS e HIP en la producción de *biofilm*, se estudió la arquitectura y la viabilidad bacteriana de los *biofilms* formados, en ausencia o en presencia (CMI/2) de los biocidas, por cultivos de MRSA previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de dichos compuestos o no expuestos. Las estructuras representativas de los *biofilms* de 24 h observadas mediante CLSM se presentan en la Figura III.1. En dicha Figura pueden verse las reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas por microscopía láser confocal utilizando el paquete informático Imaris 7.5, incluyendo las proyecciones de las sombras virtuales a la derecha.

Se observó una marcada variabilidad en la arquitectura tridimensional de los *biofilms* en función de la condición ensayada. Cuando los *biofilms* se formaron en ausencia de biocidas, las células no expuestas y las expuestas previamente a HIP produjeron estructuras compactas que cubrieron la mayor parte de la superficie del campo estudiado. Las células previamente expuestas a CB o FTS formaron *biofilms* rugosos con una superficie irregular y áreas de crecimiento confluentes donde las bacterias formaron grumos.

En presencia de CB o FTS (CMI/2) se observaron agregados de células en el caso de los cultivos no expuestos y de los previamente expuestos a ambos compuestos, mientras que las células previamente expuestas (adaptadas) a HIP mostraron una marcada capacidad para formar *biofilms* en presencia de CB. Cuando los *biofilms* se

formaron en presencia de HIP (CMI/2), las células no adaptadas produjeron una disposición espacial específica, formando estructuras de grumos bien definidas de grosor variable. Debe señalarse que las células adaptadas a HIP formaron estructuras muy robustas en presencia de este compuesto.

Con el objetivo de cuantificar numéricamente las estructuras formadas y poder así realizar un análisis estadístico, se extrajeron, a partir de las imágenes, los datos de biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad (Tablas III.1 a III.4; Figura III.2). Los datos numéricos confirmaron las observaciones visuales. Así, los *biofilms* formados en presencia de CB o de FTS presentaron menores ($P < 0,001$) valores de biovolumen ($22.682,34 \pm 32.161,94 \mu\text{m}^3$) y de porcentaje de superficie cubierta ($38,92 \pm 23,78\%$) que en los *biofilms* producidos en ausencia de biocidas ($61.972,52 \pm 48.201,34 \mu\text{m}^3$ y $78,83 \pm 21,26\%$) o en presencia de HIP ($69.425,34 \pm 58.340,92 \mu\text{m}^3$ y $71,93 \pm 23,56\%$).

Los cultivos previamente expuestos a CB o FTS mostraron una capacidad para formar *biofilm* inferior a las células no expuestas. Por el contrario, la adaptación previa a HIP potenció la formación de *biofilm*, de forma marcada en el caso de los *biofilms* formados en presencia de concentraciones subinhibitorias de FTS o HIP (Tablas III.1 y III.2; Figura III.2). Se encontró una correlación inversa entre rugosidad y biovolumen ($P < 0,001$; $r = -0,341$), así como entre rugosidad y porcentaje de superficie cubierta ($P < 0,001$; $r = -0,322$). Por el contrario, se observó una correlación directa ($P < 0,001$; $r = 0,634$) entre la rugosidad y la altura máxima. Hay que señalar que existe una relación directa entre el coeficiente de rugosidad y la heterogeneidad de los *biofilms*.

Cultivo previamente expuesto a^a:

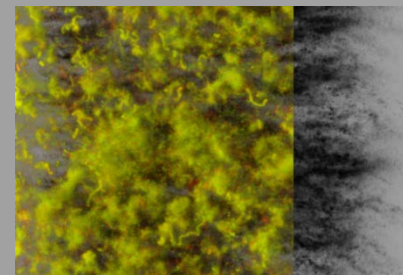
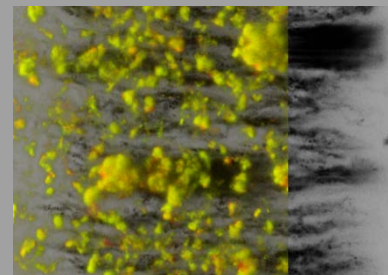
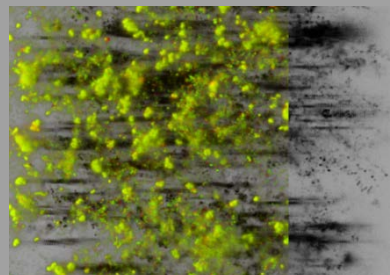
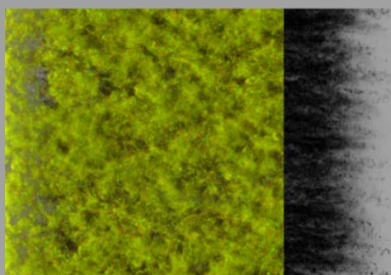
SB

CB

FTS

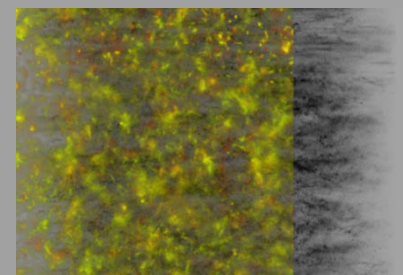
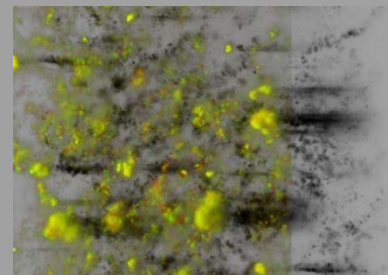
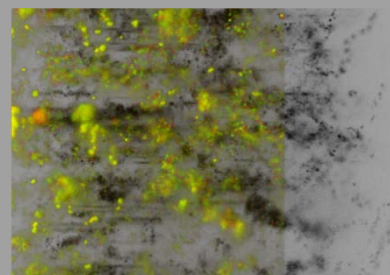
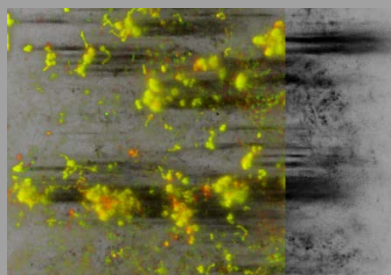
HIP

SB

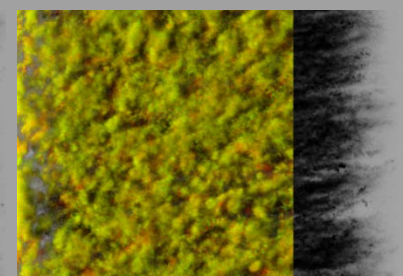
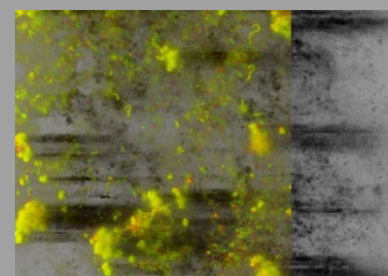
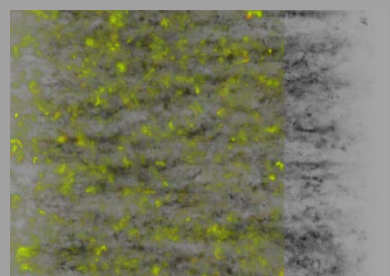
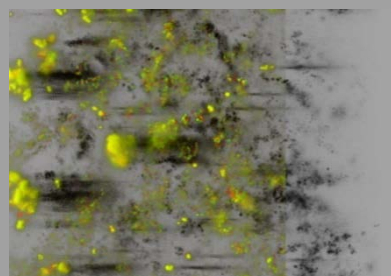


Biofilm formado en presencia de^b:

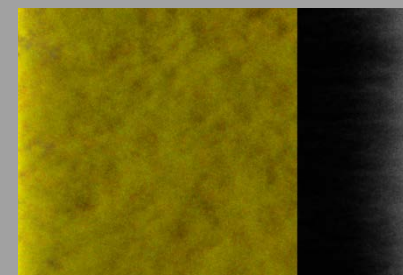
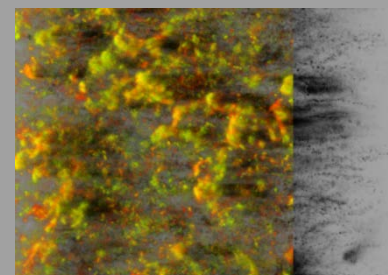
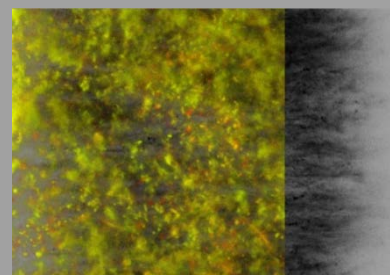
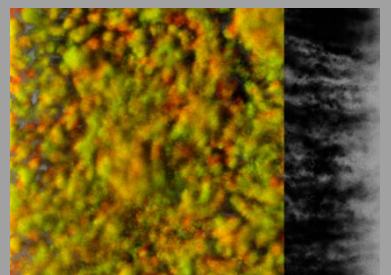
CB



FTS



HIP



^a, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas; ^b, los *biofilms* se formaron en presencia de biocidas (CMI/2). SB, sin biocida; CB, cloruro de benzalconio; FTS, fosfato trisódico; HIP, hipoclorito sódico.

Figura III.1. Proyecciones tridimensionales de los *biofilms* de MRSA 48a bajo 16 condiciones diferentes, con las proyecciones virtuales de las sombras a la derecha, obtenidas con el microscopio láser confocal de barrido y el programa Imaris.

Tabla III.1. Valores de biovolumen (μm^3) en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) de los *biofilms* formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.

<i>Biofilms</i> formados en presencia de ² :	Cultivos previamente expuestos a ¹ :			
	SB ³	CB ⁴	FTS ⁵	HIP ⁶
SB	110.320,41 \pm 62.169,18 ^a _a	32.825,13 \pm 18.229,91 ^b _a	34.540,41 \pm 26.124,84 ^b _a	70.204,13 \pm 31.603,98 ^{ab} _a
CB	26.736,87 \pm 17.372,98 ^b _b	16.584,32 \pm 19.587,65 ^a _{ab}	9.730,38 \pm 11.649,73 ^b _b	20.923,19 \pm 12.495,31 ^a _a
FTS	14.343,82 \pm 4.251,10 ^a _b	5.242,35 \pm 3.665,47 ^b _b	12.968,44 \pm 5.737,35 ^b _b	74.929,36 \pm 63.886,53 ^b _a
HIP	86.636,12 \pm 38.995,48 ^a _a	31.468,38 \pm 26.800,05 ^b _a	21.811,56 \pm 10.384,57 ^b _{ab}	137.785,31 \pm 47.682,79 ^b _b

¹, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas; ², los *biofilms* se formaron en presencia de biocidas (CMI/2); ³, SB, sin biocida; ⁴, CB, cloruro de benzalconio; ⁵, FTS, fosfato trisódico; ⁶, HIP, hipoclorito sódico.

Los datos (media \pm STD) son la media de nueve determinaciones.

Las medias que en la misma fila no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Las medias que en la misma columna no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabla III.2. Porcentajes de superficie cubierta (%) observados para los *biofilms* formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.

<i>Biofilms</i> formados en presencia de:	Cultivos previamente expuestos a:			
	SB	CB	FTS	HIP
SB	97,24 \pm 2,47 ^a _a	65,98 \pm 14,73 ^b _a	62,22 \pm 25,70 ^b _a	89,89 \pm 10,66 ^a _a
CB	55,19 \pm 15,22 ^a _b	18,36 \pm 8,29 ^b _b	22,33 \pm 13,51 ^b _b	62,07 \pm 22,18 ^b _b
FTS	35,29 \pm 8,46 ^a _c	18,66 \pm 11,03 ^b _b	26,25 \pm 15,50 ^{ab} _b	73,21 \pm 11,59 ^b _b
HIP	74,38 \pm 16,97 ^a _d	61,36 \pm 16,98 ^{ab} _a	52,91 \pm 20,32 ^b _a	99,05 \pm 1,08 ^c _a

Para interpretación, ver Tabla III.1.

Tabla III.3. Altura máxima (μm) observada para los *biofilms* formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.

<i>Biofilms</i> formados en presencia de:	Cultivos previamente expuestos a:			
	SB	CB	FTS	HIP
SB	31,00 \pm 6,07 ^a _a	35,17 \pm 8,04 ^a _a	30,67 \pm 8,80 ^a _a	32,33 \pm 8,45 ^a _a
CB	28,80 \pm 4,76 ^{ab} _a	37,33 \pm 3,61 ^a _a	18,83 \pm 11,21 ^b _b	18,50 \pm 7,85 ^b _a
FTS	40,33 \pm 7,55 ^a _b	19,83 \pm 11,25 ^b _b	40,50 \pm 6,89 ^a _a	57,17 \pm 27,68 ^a _b
HIP	42,75 \pm 4,27 ^b _b	27,00 \pm 9,63 ^b _{ab}	33,33 \pm 4,41 ^{bc} _a	36,50 \pm 3,08 ^{ac} _a

Para interpretación, ver Tabla III.1.

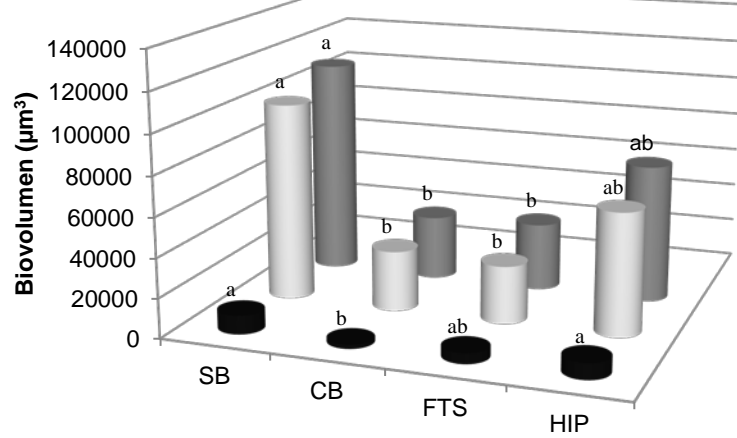
Tabla III. 4. Valores de rugosidad observados para los *biofilms* formados por MRSA 48a en ausencia o en presencia de algunos biocidas usados en la Industria Alimentaria.

<i>Biofilms</i> formados en presencia de:	Cultivos previamente expuestos a:			
	SB	CB	FTS	HIP
SB	0,387 \pm 0,128 ^a _a	0,687 \pm 0,213 ^b _{ab}	0,577 \pm 0,045 ^{bc} _{ab}	0,515 \pm 0,085 ^{ac} _a
CB	0,645 \pm 0,028 ^{ab} _b	0,780 \pm 0,138 ^a _a	0,426 \pm 0,205 ^c _a	0,476 \pm 0,077 ^{bc} _a
FTS	0,801 \pm 0,168 ^a _b	0,450 \pm 0,144 ^b _c	0,879 \pm 0,119 ^a _c	0,767 \pm 0,271 ^a _b
HIP	0,648 \pm 0,095 ^a _b	0,565 \pm 0,089 ^a _{bc}	0,680 \pm 0,129 ^a _b	0,345 \pm 0,068 ^b _a

Para interpretación, ver Tabla III.1.

Biofilm formado en ausencia de biocidas

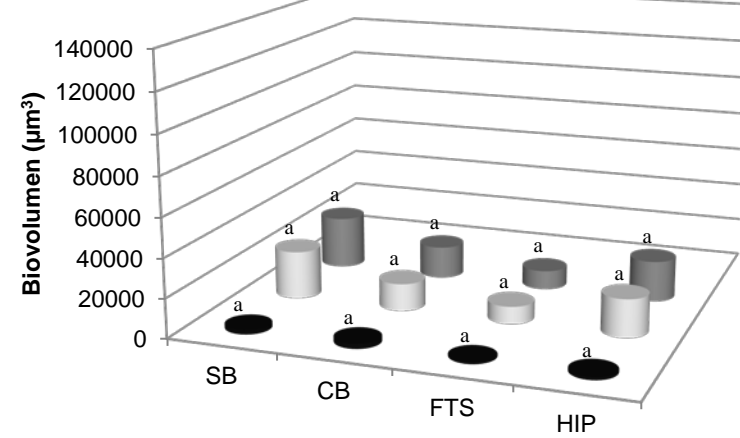
Gráfica A



Cultivo previamente expuesto a^a

Biofilm formado en presencia de CB (CMI/2)

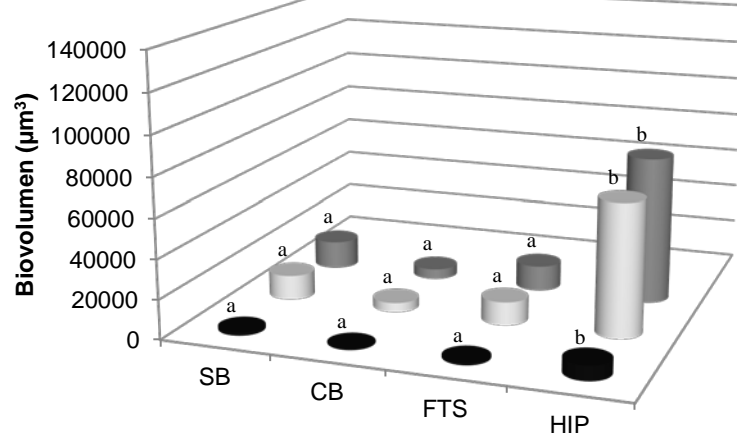
Gráfica B



Cultivo previamente expuesto a^a

Biofilm formado en presencia de FTS (CMI/2)

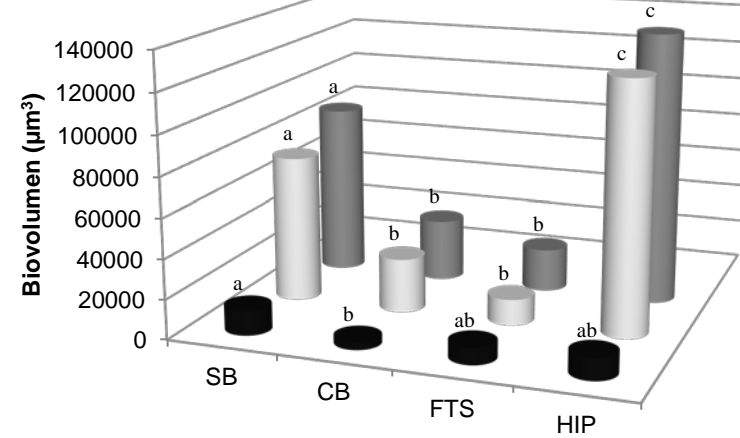
Gráfica C



Cultivo previamente expuesto a^a

Biofilm formado en presencia de HIP (CMI/2)

Gráfica D



Cultivo previamente expuesto a^a

■ Células muertas ■ Células vivas ■ Células totales

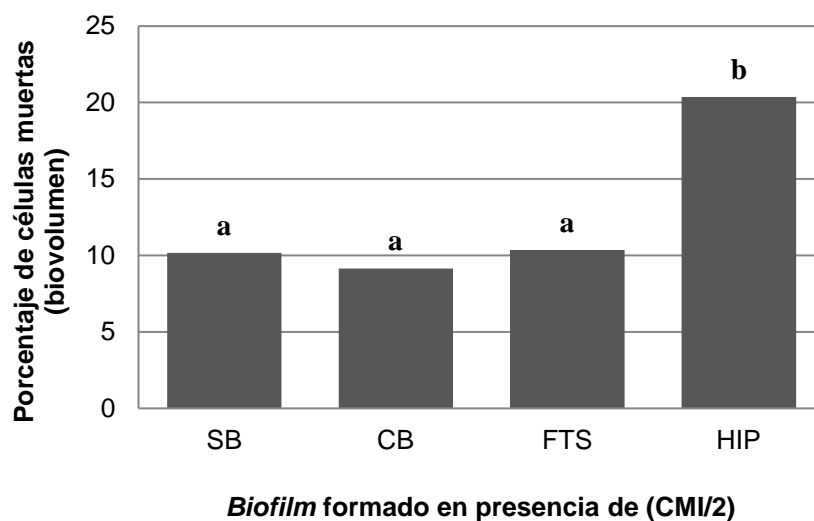
^a, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas. SB, sin biocida; CB, cloruro de benzalconio; FTS, fosfato trisódico; HIP, hipoclorito sódico. Los datos (media \pm STD) son la media de nueve determinaciones. Las barras dentro de una gráfica para el mismo estado fisiológico (células muertas, células vivas o células totales) sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura III.2. Biovolumen en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) de los *biofilms* formados por MRSA 48a en ausencia de biocidas (gráfica A) o en presencia de concentraciones subinhibitorias (CMI/2) de cloruro de benzalconio (gráfica B), fosfato trisódico (gráfica C) o hipoclorito sódico (gráfica D).

Viabilidad bacteriana

Una ventaja adicional del uso de microscopía laser confocal de barrido en el estudio que se presenta fue la posibilidad de medir no solo la biomasa total del *biofilm*, sino también de determinar por separado la cantidad de células vivas (verdes) y muertas (rojas).

Un elevado porcentaje de las bacterias del *biofilm* fue capaz de sobrevivir a la presencia de dosis bajas de biocidas. La determinación cuantitativa mediante CLSM de la viabilidad bacteriana en los *biofilms* formados por MRSA mostró porcentajes similares de bacterias inactivadas en ausencia de biocidas o en presencia de concentraciones subinhibitorias de CB o FTS. Por el contrario, los cultivos crecidos en presencia de HIP presentaron un mayor porcentaje de células muertas en el *biofilm* (Figura III.3). No obstante, la cantidad total de células vivas en las biopelículas formadas en presencia de HIP fue mayor que en las formadas en presencia de otros compuestos (CB o FTS) o en ausencia de biocidas.



SB, sin biocida; CB, cloruro de benzalconio; FTS, fosfato trisódico; HIP, hipoclorito sódico. Las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,001$).

Figura III.3. Porcentaje de bacterias muertas en los *biofilms* de MRSA 48a observados con microscopía láser confocal de barrido (n=36).

DISCUSIÓN

Adaptación de MRSA a los biocidas

Las CMI_s obtenidas para los biocidas examinados encajan en el intervalo de valores observado por otros autores para *S. aureus* y otras bacterias Gram-positivas (Capita *et al.*, 2001; Raggi *et al.*, 2013; Da Silva Garrote *et al.*, 2013). El hecho de que se ha observado una tolerancia adaptativa estable en el caso del HIP, pone de manifiesto que el uso de este biocida a dosis subletales representa un riesgo de desarrollo de adaptación a dicho compuesto, como ha sido previamente sugerido (Capita *et al.*, 2014).

Formación de *biofilm*

Este es, hasta donde llega nuestro conocimiento, el primer estudio sobre el efecto de concentraciones subinhibitorias de CB, FTS e HIP en la arquitectura de los *biofilms* de MRSA. Además, la determinación cuantitativa, mediante microscopía laser confocal de barrido, de la viabilidad de los *biofilms* de MRSA bajo las condiciones estudiadas no ha sido tampoco previamente realizada.

Se observó que la exposición previa de los cultivos a concentraciones subletales de CB o FTS, así como la formación del *biofilm* en presencia de concentraciones subinhibitorias (CMI/2) de dichos compuestos, reduce la capacidad de MRSA para formar *biofilm*, si bien la formación de estas estructuras no fue totalmente evitada. Estas observaciones son coincidentes con hallazgos previos, en los que se ha observado que concentraciones subinhibitorias de CB o FTS inhiben en algún grado la formación de *biofilm* (Raggi *et al.*, 2013; Capita *et al.*, 2014).

Por el contrario, la exposición a concentraciones subinhibitorias de HIP potenció de forma marcada la formación de *biofilm* en las células previamente adaptadas a dicho compuesto. Estos hallazgos son congruentes con investigaciones previas en las que se pone de manifiesto que el HIP a concentraciones subinhibitorias puede contribuir no solo al desarrollo de resistencia y de resistencia cruzada a un rango de antimicrobianos (Capita *et al.*, 2014; Molina-González *et al.*, 2014), sino también a la persistencia de MRSA mediante la inducción de la formación de *biofilms*. Puesto que las células de los *biofilms* son más resistentes a los antimicrobianos que las células planctónicas (*de vida libre*) (Hess *et al.*, 2011), la potenciación del desarrollo de los *biofilms* (observada en el presente trabajo en presencia dosis subletales de HIP) puede jugar un papel importante

en la supervivencia bacteriana (Ebrahimi *et al.*, 2015). Este hecho tiene importantes efectos negativos en el ámbito de la Salud Pública.

La capacidad del HIP de incrementar la capacidad de MRSA para formar *biofilm* es de particular relevancia teniendo en cuenta que se trata de un desinfectante usado comúnmente en los ambientes de procesamiento de alimentos y en los entornos clínicos para reducir la carga microbiana presente. Si bien el HIP se aplica a concentraciones superiores a la CMI, es posible que en ocasiones se alcancen concentraciones subinhibitorias del compuesto. Ello puede ocurrir como consecuencia, por ejemplo, de una aplicación inadecuada (concentración insuficiente o distribución heterogénea), de un almacenamiento incorrecto (que puede conllevar una disminución de la concentración efectiva del biocida) o de la presencia en las superficies de cantidades excesivas de materia orgánica, que, como es bien sabido, puede inactivar diferentes compuestos clorados (SCENIHR, 2009). Los resultados de este estudio enfatizan la importancia de mantener concentraciones de HIP que estén marcadamente por encima de la CMI durante los procesos de desinfección para prevenir eficientemente la formación de *biofilms* de MRSA.

Se ha sugerido que las concentraciones subinhibitorias de los compuestos antimicrobianos no interfieren de manera efectiva con el crecimiento de los microorganismos, y únicamente estos son sometidos a un estrés subletal (Kumar & Thing, 2013). Una forma en que las bacterias pueden contrarrestar el estrés externo es abandonar la vida planctónica y formar *biofilms*, que, como se ha indicado, ofrecen un mayor nivel de resistencia a los factores externos. En varios trabajos se ha examinado el efecto de niveles bajos de estrés sobre la formación de *biofilms*, y numerosos biocidas y antibióticos han demostrado inducir la formación de estas estructuras en diferentes grupos bacterianos, incluyendo *S. aureus* (Nuryastuti *et al.*, 2009; Kaplan, 2011; Kumar & Ting, 2013).

Las bacterias responden al estrés ambiental modificando su morfología o composición celular (por ejemplo, alterando la hidrofobicidad de la superficie celular), lo que les permite continuar su crecimiento y multiplicación en condiciones adversas (Dynes *et al.*, 2009; Lombardo Bedran *et al.*, 2014; Alonso-Calleja *et al.*, 2015). En un trabajo previo, hemos observado un incremento de los valores de la hidrofobicidad de la superficie celular y de la capacidad para formar *biofilm*, así como modificaciones en la morfología y ultraestructura bacteriana, en células de *E. coli* tras su exposición a concentraciones subletales, y consecuente adaptación, a HIP (Capita *et al.*, 2014).

Algunos autores han señalado también el papel de estructuras celulares especializadas, incluyendo fimbrias y *pili*, en el incremento de la capacidad de las bacterias para formar *biofilm* (Kumar & Ting, 2013). Además, se sabe que las condiciones ambientales promueven la formación de biopelículas al facilitar la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), es decir, la matriz de las biopelículas bacterianas, que supone una barrera frente a los antimicrobianos (Hess *et al.*, 2011). Estas modificaciones en los EPS pueden representar una respuesta adaptativa a dichos agentes. Sin embargo, y a pesar de estas hipótesis, los mecanismos exactos por los cuales el HIP incrementa la capacidad de MRSA para formar *biofilm* no han sido aún caracterizados, por lo que serían recomendables nuevas investigaciones que permitan dilucidar los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares en los *biofilms* de MRSA inducidos por concentraciones subinhibitorias del biocida.

Viabilidad bacteriana

En el presente estudio, una ventaja adicional del empleo de la microscopía láser confocal de barrido (CLSM) ha sido la posibilidad de medir no solo la biomasa total del *biofilm*, sino también la cantidad de bacterias vivas (verdes) y muertas (rojas).

Se ha observado que muchas bacterias en los *biofilms* fueron capaces de sobrevivir al tratamiento con dosis bajas de biocidas. La determinación cuantitativa por CLSM de la viabilidad bacteriana en los *biofilms* de MRSA mostró porcentajes similares de inactivación bacteriana en ausencia de biocidas y en presencia de concentraciones subinhibitorias de CB o FTS. Por el contrario, los cultivos que crecieron en presencia de HIP presentaron un mayor porcentaje de células muertas (Figura III.3). A pesar de ello, la cantidad total de células vivas en los *biofilms* formados en presencia de HIP fue superior que en aquellos formados en presencia de CB o FTS, dada la menor biomasa en estos últimos.

El bajo porcentaje (aproximadamente 10%) de células teñidas con YP en los *biofilms* formados en presencia de CB o FTS indica que las membranas celulares de la mayoría de las células no están comprometidas. Sin embargo, el bajo biovolumen y escaso porcentaje de superficie cubierta observado en comparación con los encontrados en las muestras control (no expuestas) ponen de manifiesto una escasa capacidad de multiplicación en el caso de las células de los *biofilms* formados en presencia de CB o FTS. Lo que ocurre, aparentemente, es que la mayoría de las células en los *biofilms* tratados con CB o FTS fueron resistentes a concentraciones

subinhibitorias de dichos compuestos, si bien las células estaban sometidas a un factor de estrés, al cual respondieron reduciendo su tasa de multiplicación, como ha sido sugerido por otros autores (Dynes *et al.*, 2009).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2015). Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**, 86-94.
- Cairns, S., Thomas, J. G., Hooper, S. J., Wise, M. P., Frost, P. J., Wilson, M. J., Lewis, M. A., Williams, D. W. (2011). Molecular analysis of microbial communities in endotracheal tube biofilms. *PLoS ONE* **6** (3), e14759.
- 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., García-Fernández, M. C., Moreno, B. (2001). Influence of strain and trisodium phosphate concentration on growth parameters of *Listeria monocytogenes in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 428-432.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M. C., Moreno, B. (2002). Review: trisodium phosphate (TSP) treatment for decontamination of poultry. *Food Science and Technology International* **8**, 11-24.
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 1268-1280.
- CLSI -Clinical and Laboratory Standards Institute- (2013). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals*, 4th ed. Approved standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Da Silva Garrote, M., Gonçalves de Alencar, A. H., Rodrigues de Araújo Estrela, C., de Souza, H. A., Silveira Alves, D. R., Estrela, C. (2013). Antibacterial effect of oral antiseptics on facultative bacteria. *Stomatós* **19**, 28-39.
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31**, 173-180.
- Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Korber, D. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., Hitchcock, A. P. (2009). Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Canadian Journal of Microbiology* **55**, 163-178.
- Ebrahimi, A., Hemati, M., Shabanpour, Z., Dehkordi, S. H., Bahadoran, S., Lotfalian, S., Khubani, S. (2015). Effects of benzalkonium chloride on planktonic growth and biofilm formation by animal bacterial pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology* **8** (2), e16058.
- EFSA -European Food Safety Authority- (2009). Assessment of the Public Health significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA Journal* **993**, 1-73.

- Fernández-Barat, L., Bassi, G. L., Ferrer, M., Bosch, A. M., Calvo, M., Vila, J., Gabarrús, A., Martínez-Olondris, P., Rigol, M., Esperatti, M., Luque, N., Torres, A. (2012). Direct analysis of bacterial viability in endotracheal tube biofilm from a pig model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia following antimicrobial therapy. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **65**, 309-317.
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M. A., Pérez Pullido, R., Gálvez, A., Ortega, E. (2017). Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology* **63**, 58-71.
- Hess, D. J., Henry-Stanley, M., Wells, C. L. (2011). Gentamicin promotes *Staphylococcus aureus* biofilms on silk suture. *Journal of Surgical Research* **170**, 302-308.
- Houari, A., Di Martino, P. (2007). Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 652-656.
- Jones, T. F., Kellum, M. E., Porter, S. S., Bell, M., Schaffner, W. (2002). An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Disease* **8**, 82-84.
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *International Journal of Artificial Organs* **34**, 737-751.
- Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Goessens, W., Hollis, R., Messer, S., Herwaldt, L., Bruining, H., Heck, M., Rost, J., van Leeuwen, N., van Belkum, A., Verbrugh, H. (1995). Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1121-1128.
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., Van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W., Friederich, A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance* **15** (41), pii=19688.
- Kraushaar, B., Fetsch, A. (2014). First description of PVL-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wild boar meat. *International Journal of Food Microbiology* **186**, 68-73.
- Kumar, A., Ting, Y.-P. (2013). Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **111**, 747-754.
- Larsen, J., Stegger, M., Andersen, P. S., Petersen, A., Larsen, A. R., Westh, H., Agersø, Y., Fetsch, A., Kraushaar, B., Käsbohrer, A., Feßler, A. T., Schwarz, S., Cuny, Ch., Witte, W., Butaye, P., Denis, O., Haenni, M., Madec, J.-Y., Jouy, E., Laurent, F., Battisti, B., Franco, A., Alba, P., Mammina, C., Pantosti, A., Monaco, M., Wagenaar, J. A., de Boer, E., van Duinkerken, E., Heck, M., Domínguez, L., Torres, C., Zarazaga, M., Price, L. B., Skov, R. L. (2016). Evidence for human adaptation and foodborne transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Disease* **63**, 1431-1438.

- Lee, S., Choi, K.-H., Yoon, Y. (2014). Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* outbreak linked to ham. *Korean Journal for Food Science of Animal Resource* **34**, 257-261.
- Lombardo Bedran, T. B., Grignon, L., Palomari Spolidorio, D., Grenier, D. (2014). Subinhibitory concentrations of triclosan promote *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to oral epithelial cells. *PLoS ONE* **9** (2), e89059.
- Luther, M. K., Bilida, S., Mermel, L. A., LaPlante, K. L. (2015). Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infectious Diseases and Therapy* **4** (2), 219-226.
- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**, 329-334.
- Normanno, G., Dambrosio, A., Lorusso, V., Samoilis, G., Di Taranto, P., Parisi, A. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. *Food Microbiology* **51**, 51-56.
- Nuryastuti, T., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Irvati, S., Aman, A. T., Krom, B. P. (2009). Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6850-6855.
- Oniciuc, E.-A., Ariza-Miguel, J., Bolocan, A.-S., Díez-Valcarce, M., Rovira, J., Hernández, M., Fernández-Natal, I., Nicolau, A. I., Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *International Journal of Food Microbiology* **209**, 34-38.
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. (2014). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **189**, 106-112.
- Otter, J. A., French, G. L. (2010). Molecular epidemiology of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infectious Diseases* **10**, 227-239.
- Raggi, C., Filippini, P., Monaco, M., Pantosti, A., Creti, R., Baldassarri, L. (2013). Methicillin resistance, biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Clinical Microbiology* **2** (6), 1000121.
- Redelman, C. V., Maduakolam, Ch., Anderson, G. G. (2012). Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **66**, 411-418.
- Rello, J., Afessa, B., Anzueto, A., Arroliga, A. C., Olson, M. E., Restrepo, M. I., Talsma, S. S., Bracken, R. L., Kollef, M. H. (2010). Activity of a silver-coated endotracheal tube in preclinical models of ventilator-associated pneumonia and a study after extubation. *Critical Care Medicine* **4**, 1135-1140.

SCENIHR -*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*- (2009). *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009*. European Communities, Brussels.

Souza, S. G., Campos, G. B., Oliveira, P. S., Sousa, D. S., Da Silva, D. C. C., Santos, V. M., Amorim, A. T., Santos, A. M. O. G., Timenetsky, J., Cruz, M. P., Yatsuda, R., Marques, L. M. (2014). Virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ICU units in Brazil. *Advances in Microbiology* **4**, 207-215.

Traversa, A., Gariano, G. R., Gallina, S., Bianchi, D. M., Orusa, R., Domenis, L., Cavalleiro, P., Fossati, L., Serra, R., Decastelli, L. (2015). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and wild animal carcasses in Italy. *Food Microbiology* **52**, 154-158.

CAPÍTULO IV

Efecto de concentraciones subletales de biocidas en los parámetros estructurales y la viabilidad de los *biofilms* formados por *Salmonella* Typhimurium

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La salmonelosis es la segunda zoonosis más importante (tras la campilobacteriosis) por lo que respecta a su prevalencia en el ámbito mundial (CDC, 2014; EFSA-ECDC, 2016) y más del 95% de los casos de enfermedad humana son de origen alimentario (Nguyen *et al.*, 2014). En 2015, *Salmonella* fue responsable de 94.625 casos de enfermedad y 126 fallecimientos en la Unión Europea, resultando en una tasa de notificación de 21,2 casos por 100.000 habitantes (EFSA-ECDC, 2016). Los dos serotipos de *Salmonella* más frecuentemente asociados con salmonelosis humana en la Unión Europea son *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, que supusieron en 2015 el 45,7% y el 15,8%, respectivamente, de los casos de enfermedad (EFSA-ECDC, 2016). Es de destacar la importancia de *S. Typhimurium* en el ámbito de la Salud Pública dada su elevada capacidad para causar enfermedad humana (Capita *et al.*, 2007).

Los microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, como *Salmonella*, crecen principalmente en forma de biopelículas o *biofilms* sobre superficies sólidas, en lugar de hacerlo como células planctónicas (en estado libre), y muchos brotes por *Salmonella* se han asociado con la presencia de *biofilms* en los entornos de procesado de alimentos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2008; Díez-García *et al.*, 2012; Corcoran *et al.*, 2014). La capacidad de los microorganismos para formar *biofilms* supone un problema importante para las industrias alimentarias. Los efectos perjudiciales de las biopelículas incluyen contaminación de los alimentos por microorganismos patógenos y alterantes, a la vez que provocan fallos técnicos en muchos sistemas industriales, como torres de refrigeración, intercambiadores de calor, filtros o tuberías (Nguyen *et al.*, 2014). Además, los *biofilms* pueden conferir resistencia bacteriana frente a diferentes tipos de estrés ambiental, antibióticos y procedimientos de limpieza y desinfección (L+D), y como consecuencia son extremadamente difíciles de erradicar, tanto en las industrias alimentarias como en el ámbito clínico. Se ha indicado que las células que forman parte de los *biofilms* son unas 1.000 veces más resistentes a los agentes antimicrobianos que las bacterias planctónicas, probablemente debido a una combinación de varios factores, como son el difícil acceso de los antimicrobianos, la limitación de nutrientes, la respuesta al estrés adaptativo o la inducción de variabilidad fenotípica (Miladi *et al.*, 2016). Por ello, en los últimos años se han dedicado grandes esfuerzos a mantener una higiene eficiente en las industrias de alimentos y evitar así la formación de *biofilms*. Con este objetivo, una gran variedad de biocidas, entre los que se incluyen cloruro de

benzalconio (CB), fosfato trisódico (FTS) e hipoclorito sódico (HIP), se emplean de manera rutinaria en los ambientes de procesamiento de alimentos (Dynes *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2014).

En la Industria Alimentaria las bacterias están frecuentemente expuestas a concentraciones subinhibitorias de biocidas, como consecuencia, por ejemplo, de una aplicación inadecuada de los compuestos (concentración insuficiente o distribución heterogénea), un almacenamiento incorrecto de las formulaciones, que resulta en una disminución de la concentración efectiva de los desinfectantes, o la presencia de cantidades excesivas de materia orgánica, que puede inactivar algunos biocidas, como los compuestos clorados (Capita *et al.*, 2014). Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunos biocidas, cuando están presentes a concentraciones inferiores a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), pueden estimular la formación de *biofilms* en diversas especies bacterianas (Houari & Di Martino, 2007; Redelman *et al.*, 2012; Capita *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2014; Luther *et al.*, 2015). Sin embargo, el CB, el FTS y el HIP no han sido ensayados hasta el momento frente a *Salmonella* para determinar estos aspectos, a pesar de que un estudio de este tipo proporcionaría información muy útil en el escenario de la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública.

Una de las técnicas de imagen más completas utilizadas para estudiar la arquitectura de los *biofilms* es la microscopía láser confocal de barrido (*confocal laser scanning microscopy*; CLSM). Mediante el uso de colorantes fluorescentes selectivos, esta técnica permite realizar un análisis cuantitativo de la viabilidad bacteriana en el *biofilm*, determinación que ha demostrado ser de gran valor para conocer la susceptibilidad de las bacterias a los biocidas (Stiefel *et al.*, 2015).

El objetivo de este trabajo ha sido determinar si la exposición, y la consecuente adaptación, de *S. Typhimurium* a concentraciones subinhibitorias de tres biocidas (cloruro de benzalconio, fosfato trisódico e hipoclorito sódico), puede influir en la capacidad de la bacteria para formar *biofilms*. Con esta finalidad, se realizó un estudio cuantitativo, mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM), de los parámetros estructurales (biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad) y de la viabilidad de los *biofilms* formados por una cepa de *S. Typhimurium* (S175) de origen alimentario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (S175) previamente aislada de carne de ave. La cepa se conservó a -80 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) suplementado con glicerol al 20% (v/v). Antes de comenzar los experimentos, las células criopreservadas fueron subcultivadas dos veces en TSB a 37 ± 1 °C. Los cultivos de trabajo se mantuvieron a 4 ± 1 °C en placas de agar triptona de soja (TSA, Oxoid) y se subcultivaron mensualmente.

Biocidas

Se ensayaron tres biocidas: cloruro de benzalconio (CB, Fluka, Deisenhofen, Alemania), fosfato trisódico (FTS, Merck, Darmstadt, Alemania) e hipoclorito sódico (aproximadamente 10% de cloro activo) (HIP, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Las soluciones se prepararon asépticamente antes de cada experimento en agua destilada estéril.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Los valores de las CMIs se establecieron utilizando un método de dilución en placas de microtítulo (CLSI, 2013). Se tomaron cinco colonias de la cepa S175 de placas de TSA, que se inocularon en 10 ml de caldo Mueller-Hinton (MH, Oxoid) y se incubaron a 37 °C. Experimentos anteriores habían puesto de manifiesto que después de 24 h de incubación estos cultivos bacterianos contenían aproximadamente 5×10^8 ufc/ml. Para el experimento, se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 20 µl de la solución de los desinfectantes (se utilizó un intervalo de concentraciones para cada biocida) y 180 µl de las diluciones apropiadas (en caldo MH) de inóculo para obtener una concentración final en el pocillo de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml. La concentración del inóculo se confirmó mediante siembra en placa. Las placas de microtítulo se incubaron a 37 °C en un equipo turbidimétrico automatizado (Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves Ab), que mide la absorbancia del cultivo a intervalos regulares. En cada experimento se incluyeron controles positivos (200 µl de inóculo a 5×10^5 ufc/ml) y negativos (180 µl de caldo MH + 20 µl de solución química). Los experimentos se repitieron cinco veces en diferentes días. La CMI se estableció como la concentración de biocida más baja necesaria para evitar el crecimiento después de 48 h de incubación.

Adaptación a concentraciones crecientes de los biocidas

El ensayo se realizó utilizando el procedimiento descrito para determinar la CMI. La concentración inicial de biocida fue CMI/2. Cuando se observó crecimiento, se transfirieron asépticamente 20 μ l de la suspensión al pocillo siguiente, que contenía 160 μ l de caldo MH y 20 μ l de la solución química. Después de la transferencia, cada pocillo contenía una concentración de biocida 1,5 veces mayor que el pocillo anterior. Este procedimiento continuó hasta que no se observó crecimiento después de 72 h de incubación a 37 °C. La suspensión en el último pocillo con crecimiento registrado se sembró en placas de TSA con biocida (se añadió al medio TSA la mitad de la concentración máxima de biocidas que permitía el crecimiento microbiano). Las células no expuestas se hicieron crecer en TSB y posteriormente se sembraron en placas de TSA sin biocidas. Después de la incubación a 37 °C durante 48 h, las placas de agar se mantuvieron a 4 ± 1 °C durante un tiempo máximo de una semana. Todos los grupos de células (no expuestas y expuestas a CB, FTS o HIP) se ensayaron simultáneamente después del mismo número de días de almacenamiento en las placas de medio de cultivo.

Estabilidad de los cultivos adaptados

La estabilidad de la tolerancia adaptativa se determinó para cada compuesto cultivando repetidamente la cepa S175 en caldo no selectivo (TSB) sin biocidas. Este procedimiento se repitió cada 24 h durante 10 días. Al cabo de de 10 días, se determinó la capacidad de las cepas para crecer en presencia de la concentración máxima de biocidas que permitía el crecimiento microbiano inmediatamente después de la exposición a concentraciones crecientes de los compuestos.

Estudio de los *biofilms*

El estudio de los *biofilms* se realizó utilizando un método previamente descrito por Capita *et al.* (2014), con algunas modificaciones menores. Inicialmente, los cultivos se hicieron crecer a 37 °C durante 18 h en TSB, haciéndose posteriormente dos diluciones decimales en el mismo caldo de cultivo para obtener una concentración de aproximadamente 10^6 ufc/ml. Se utilizó TSB con biocida (se añadió la CMI/2) para el crecimiento y dilución de células previamente expuestas, mientras que en el caso de células no expuestas se empleó TSB sin biocidas. Se añadió un volumen de 250 μ L a los pocillos de placas de microtítulo de vidrio estériles de 96 pocillos Matrix® (Thermo Scientific, New Hampshire, EE.UU.). Después de 60 minutos de adhesión a 37 °C, los

pocillos se lavaron con NaCl 150 mM para eliminar cualquier bacteria no adherida, antes de rellenarse con 250 μ l de caldo de cultivo. Se añadió TSB con biocidas (CMI/2) y sin biocidas a todos los grupos de pocillos (que contenían células no expuestas y células previamente expuestas a CB, FTS o HIP). Así, se ensayaron un total de 16 condiciones diferentes. Después de la incubación de la placa durante 24 h a 37 °C, los pocillos se lavaron con NaCl 150 mM. Se añadieron a cada pocillo volúmenes de 250 μ l de una solución compuesta por 2,5 μ l de una mezcla 1:1 de los colorantes fluorescentes SYTO9 (*stock* 3,34 mM en DMSO) y yoduro de propidio (YP, *stock* 20 mM en DMSO) del kit de viabilidad LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y 1.000 μ L de TSB. Posteriormente, la placa se incubó en oscuridad a 30 °C durante 20 minutos para permitir el marcado fluorescente de las bacterias. En la observación al microscopio (CLSM), el SYTO9 emite fluorescencia verde y se utiliza para identificar los microorganismos vivos con membranas intactas, mientras que el YP emite fluorescencia roja y tiñe las bacterias muertas, con membranas dañadas. Por lo tanto, las células muertas y las viables pueden identificarse simultáneamente.

Para la visualización de los *biofilms* se utilizó un microscopio láser confocal de barrido (CLSM) Nikon Eclipse TE 2000-U con el programa EZ-C13.60 (Nikon Instruments Inc., New York, EE.UU.). Todas las biopelículas fueron escaneadas a 400 Hz, usando como objetivo una lente de 40 \times . La fluorescencia se detectó mediante excitación a 488 nm (láser de argón) y las emisiones se recogieron con un filtro 590/50 (SYTO9) o 650LP (yoduro de propidio).

Por cada *biofilm* formado, se obtuvieron tres imágenes (512 \times 512 píxeles, lo que corresponde a 119 \times 119 μ m) en 3 zonas de cada pocillo seleccionadas aleatoriamente. Se realizaron un total de 3 experimentos independientes (en días diferentes) para cada condición. Para el análisis de las imágenes se procedió a reconstruir las proyecciones tridimensionales de las estructuras de las biopelículas utilizando para ello el programa Imaris 7.5 (Bitplane, Zurich, Suiza). Para calcular los parámetros estructurales de los *biofilms*, como su biovolumen, porcentaje de superficie cubierta y rugosidad, se utilizó el programa informático BioRCA 1.4, desarrollado por nuestro Grupo de Investigación en el entorno *Lazarus*. Este programa permite la cuantificación de la población total del *biofilm* (incluyendo bacterias vivas y muertas), así como de las subpoblaciones independientes representadas por fluorescencia verde (células vivas) o roja (células inactivadas). El biovolumen representa el volumen total de células (μ m³) presentes en el campo de observación (14.161 μ m²) y proporciona una estimación de la cantidad de biomasa de la

biopelícula formada. El porcentaje de superficie cubierta (%) refleja la eficiencia de la formación de sustrato por la comunidad bacteriana. La rugosidad proporciona una medida de la variación en el grosor del *biofilm* en diferentes puntos y se utilizó como un indicador de heterogeneidad del *biofilm*. Finalmente, la altura máxima (μm) de los *biofilms* se determinó a partir del número de secciones ópticas de una micra en el eje z.

Análisis estadístico

Los parámetros estructurales cuantitativos de las biopelículas se compararon mediante el uso de técnicas de análisis de varianza (ANOVA). La separación de medias se realizó con ayuda de la prueba de rango múltiple de Duncan. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con el programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

RESULTADOS

Adaptación a los biocidas

Utilizando el método de microdilución en caldo, los valores de las CMI_s de las células de *Salmonella* antes de la exposición a concentraciones subinhibidoras de los biocidas fueron de 8,0 µg/ml (CB), 18,0 mg/ml (FTS) y 6,0 mg/ml (HIP). Tras la exposición a concentraciones crecientes de los biocidas, la concentración máxima de los compuestos que permitió el crecimiento bacteriano fue de 30,4 µg/ml (CB), 13,5 mg/ml (FTS) y 10,1 mg/ml (HIP). La tolerancia adaptativa al CB y al HIP fue estable tras sucesivos pases en caldo no selectivo sin biocidas (la cepa se cultivó en TSB sin biocida cada 24 h durante 10 días). No se observó adaptación al FTS.

Arquitectura de los *biofilms*

En medio de cultivo (TSB) libre de biocidas, la cepa S175 formó un *biofilm* bien establecido y estructuralmente complejo, con más del 90% del substrato cubierto (Figura IV.1). La adaptación previa al HIP incrementó ($P < 0,001$) la capacidad de la cepa para formar *biofilm* (biovolumen $284.926,63 \pm 113.508,33 \mu\text{m}^3$ en el campo observado - $14.161 \mu\text{m}^2$ -) (Figura IV.1D) con respecto a las células no adaptadas (Figura IV.1A) y aquellas expuestas previamente a CB (Figura IV.1B) o FTS (Figura IV.1C) (biovolumen medio de las tres condiciones: $101.366,59 \pm 45.551,57 \mu\text{m}^3$), a la vez que disminuyó la rugosidad (un cambio negativo en el coeficiente de rugosidad indica una disminución en la heterogeneidad del *biofilm*).

Se observaron diferencias en la estructura tridimensional de los *biofilms* dependiendo del compuesto con el que las células habían entrado en contacto durante el proceso de formación de la biopelícula. Los *biofilms* formados en presencia de CB presentaron una baja biomasa, con pequeños grupos de bacterias vivas (verdes) y muertas (rojas), independientemente de la adaptación previa (Figura IV.2).

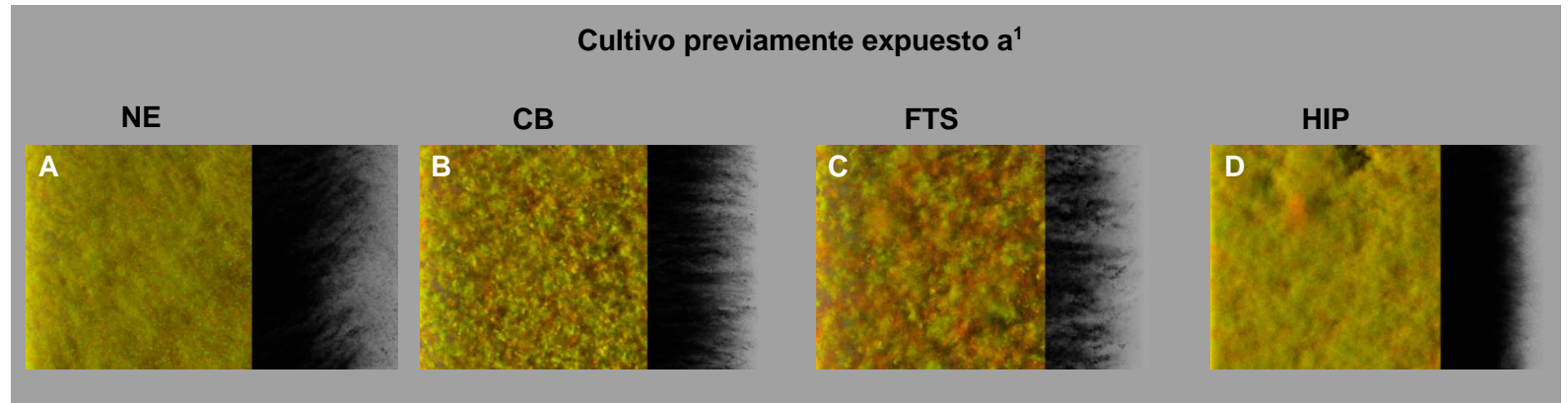
Cuando se cultivaron en presencia de FTS (CMI/2), las células no expuestas (Figura IV.3A) y las previamente expuestas a CB (Figura IV.3B) o FTS (Figura IV.3C) formaban colonias pequeñas de células en la superficie de vidrio. Sin embargo, cuando las células se habían adaptado previamente a HIP (Figura IV.3D), el *biofilm* formado en presencia de FTS cubrió la mayor parte de la superficie del campo observado, y se encontró un biovolumen mayor ($P < 0,01$) en los *biofilms* producidos por las células adaptadas a HIP ($20.728,15 \pm 12.596,98 \mu\text{m}^3$) que en los otros grupos de células (media de $8.831,07 \pm 3.981,66 \mu\text{m}^3$).

La arquitectura de los *biofilms* formados en presencia de concentraciones subinhibitorias de HIP se muestra en la Figura IV.4. La adaptación previa a HIP (Figura IV.4D) dio lugar a un aumento ($P < 0,001$) de la biomasa del *biofilm* ($238.457,59 \pm 158.632,34 \mu\text{m}^3$) en relación con los cultivos no expuestos (Figura IV.4A) y con los expuestos previamente a CB (Figura IV.4B) o FTS (Figura IV.4C) ($66.607,72 \pm 44.065,17 \mu\text{m}^3$, como media). La adaptación previa a HIP también incrementó el porcentaje de superficie cubierta ($97,22 \pm 5,65\%$ vs $80,38 \pm 18,42\%$, $P < 0,05$), altura máxima ($49,67 \pm 11,99 \mu\text{m}$ vs $29,45 \pm 7,82 \mu\text{m}$, $P < 0,001$) y rugosidad ($0,3904 \pm 0,1374$ vs $0,5924 \pm 0,1481$; $P < 0,01$).

En la Figura IV.5 se compara la capacidad de formación de *biofilm* de la cepa S175 en presencia de concentraciones bajas (CMI/2) de diferentes biocidas. La presencia de CB o FTS redujo significativamente la formación de *biofilm* por *S. Typhimurium*, tanto en los cultivos no expuestos (Figura IV.5A) como en los cultivos previamente expuestos a CB (Figura IV.5B), FTS (Figura IV.5C) o HIP (Figura IV.5D). En presencia de HIP, las células de *Salmonella* tenían una capacidad reducida para formar *biofilm* en relación con las células cultivadas en ausencia de biocidas, en el caso de los cultivos no expuestos (Figura IV.5A) o expuestos previamente a FTS (Figura IV.5C). Por el contrario, los cultivos previamente adaptados a CB (Figura IV.5B) o HIP (Figura IV.5D) mostraron una capacidad similar ($P > 0,05$) para formar *biofilms*, tanto en ausencia de biocidas como en presencia de concentraciones subinhibitorias de HIP.

Determinación de la viabilidad del *biofilm*

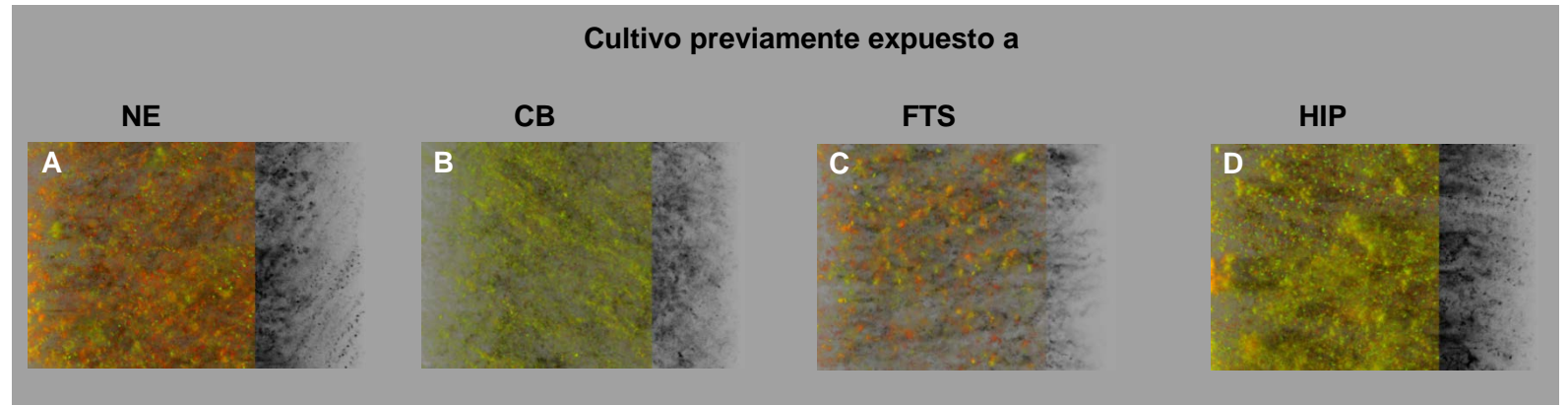
La mayor parte de las células de los *biofilms* se tiñeron con SYTO9 (células vivas; $73,70 \pm 16,59\%$ del biovolumen total). En los cultivos previamente expuestos a FTS se observó un mayor ($P < 0,01$) porcentaje de células muertas ($34,08 \pm 13,74\%$) que en los cultivos no expuestos ($22,98 \pm 16,16\%$) o en aquellos previamente expuestos a CB ($25,50 \pm 21,59\%$) o a HIP ($22,63 \pm 8,37\%$). La presencia de biocidas durante el proceso de formación del *biofilm* no disminuyó significativamente ($P > 0,05$) la viabilidad celular, observándose porcentajes similares de células muertas en los *biofilms* formados en ausencia de biocidas ($22,36 \pm 12,71\%$) o en presencia de CB, FTS o HIP (valor medio $27,61 \pm 17,70\%$).



	NE	CB	FTS	HIP
Biovolumen (μm^3) en el campo observado ($14.161 \mu\text{m}^2$)				
Total	129.358,28 \pm 34.659,34a	102.799,53 \pm 61.220,05a	71.941,96 \pm 11.134,23a	284.926,63 \pm 113.508,33b
Células vivas (verdes)	116.204,21 \pm 31.773,57a	81.565,41 \pm 46.994,78ab	41.709,36 \pm 7.628,68b	237.669,69 \pm 101.342,90c
(porcentaje)	(89,83 \pm 1,25a)	(79,34 \pm 3,22b)	(57,98 \pm 5,18c)	(83,41 \pm 4,98b)
Células muertas (rojas)	13.154,07 \pm 3.196,77a	21.234,12 \pm 14.693,39ab	30.232,59 \pm 6.005,18b	47.256,94 \pm 18.630,75c
(porcentaje)	(10,17 \pm 1,25a)	(20,66 \pm 3,22b)	(42,02 \pm 5,18c)	(16,59 \pm 4,98b)
Superficie cubierta (%)	99,19 \pm 0,92a	91,68 \pm 8,38b	94,65 \pm 2,61ab	99,81 \pm 0,19a
Altura máxima (μm)	38,17 \pm 5,60a	31,50 \pm 8,55ab	29,83 \pm 2,32b	38,50 \pm 7,82a
Rugosidad	0,4157 \pm 0,0320a	0,4901 \pm 0,1195a	0,5082 \pm 0,0328a	0,2290 \pm 0,1136b

¹, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas; NE, no expuestos (A); CB, cloruro de benzalconio (B); FTS, fosfato trisódico (C); HIP, hipoclorito sódico (D). Los datos (media \pm STD) son el valor medio de nueve determinaciones. Los valores medios en la misma fila sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Las imágenes corresponden a las proyecciones virtuales tridimensionales de los *biofilms* con la sombra a la derecha, obtenidas con el programa Imaris tras tinción con el kit de viabilidad LIVE/DEAD[®] (SYTO9 y yoduro de propidio). Las células vivas están teñidas de verde y las células muertas teñidas de rojo.

Figura IV.1. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los *biofilms* formados por *Salmonella Typhimurium* S175 en ausencia de biocidas.

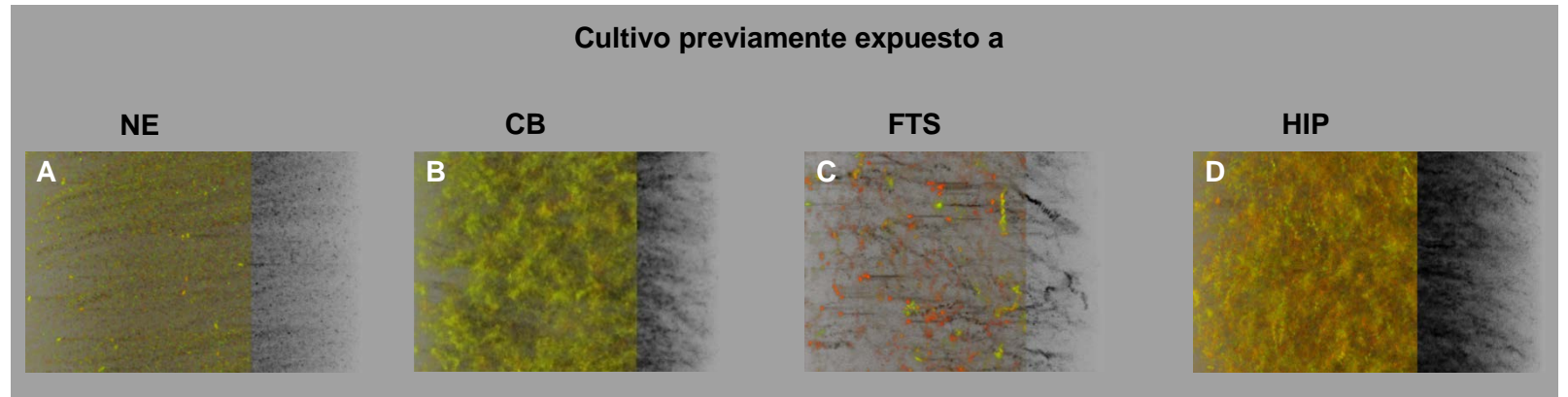


Biovolumen (μm^3) en el campo observado ($14.161 \mu\text{m}^2$)

Total	16.541,20 \pm 4.325,98a	12.509,85 \pm 5.976,56a	8.725,37 \pm 5.924,39a	15.312,25 \pm 6.918,67a
Células vivas (verdes)	8.316,15 \pm 2.862,09a	11.086,46 \pm 5.053,27a	6.649,23 \pm 5.716,01a	12.456,79 \pm 4.887,38a
(porcentaje)	(50,27 \pm 6,12a)	(88,62 \pm 1,64b)	(76,21 \pm 18,86c)	(81,35 \pm 5,68b)
Células muertas (rojas)	8.225,15 \pm 1.975,20a	1.423,40 \pm 927,99b	2.076,14 \pm 785,09b	2.855,46 \pm 2.057,92b
(porcentaje)	(49,73 \pm 6,12a)	(11,38 \pm 1,64b)	(23,79 \pm 18,86c)	(18,65 \pm 5,68b)
Superficie cubierta (%)	58,66 \pm 7,92a	59,58 \pm 14,17ab	35,14 \pm 18,07b	51,54 \pm 14,22ab
Altura máxima (μm)	23,40 \pm 6,11a	17,67 \pm 11,38a	15,83 \pm 5,98a	24,33 \pm 7,20a
Rugosidad	0,5165 \pm 0,0286ab	0,4489 \pm 0,0347c	0,4794 \pm 0,0264ac	0,5397 \pm 0,0539b

Para interpretación, ver Figura IV.1.

Figura IV.2. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los *biofilms* formados por *Salmonella Typhimurium* S175 en presencia de cloruro de benzalconio (CMI/2).

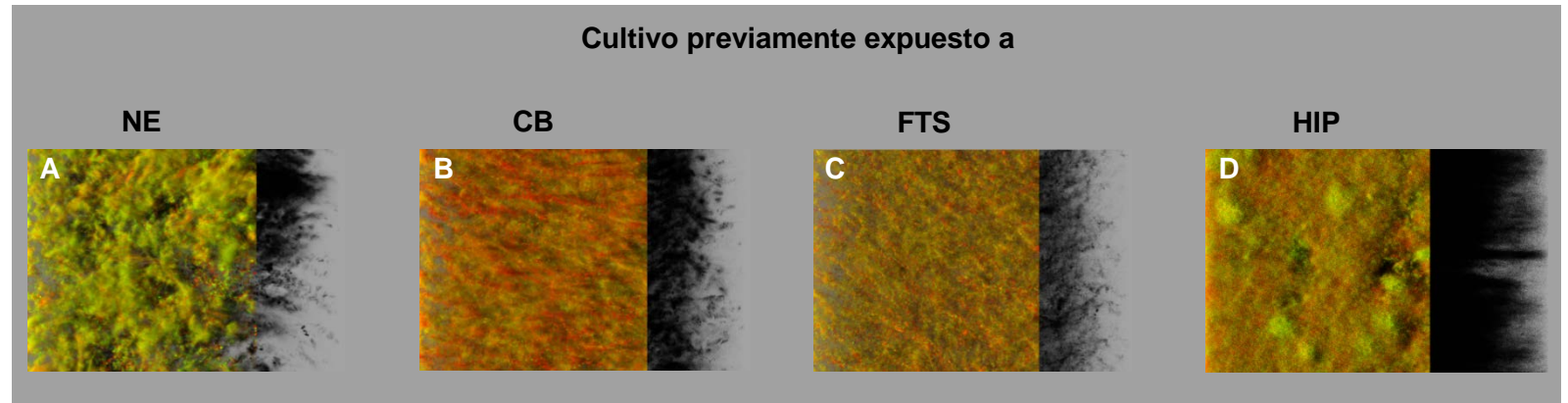


Biovolumen (μm^3) en el campo observado ($14.161 \mu\text{m}^2$)

Total	7.573,71 \pm 1.291,78a	12.949,09 \pm 3.719,99ab	5.970,42 \pm 1.521,39a	20.728,15 \pm 12.596,98b
Células vivas (verdes)	6.459,65 \pm 1.306,28ab	11.945,49 \pm 3.664,57ac	3.478,22 \pm 1.293,01b	14.935,41 \pm 7.258,96c
(porcentaje)	(85,29 \pm 5,47ab)	(92,25 \pm 3,23a)	(58,26 \pm 9,16c)	(72,05 \pm 13,14b)
Células muertas (rojas)	1.114,06 \pm 386,28a	1.003,60 \pm 383,95a	2.492,20 \pm 417,30ab	5.792,74 \pm 5.556,44b
(porcentaje)	(14,71 \pm 5,47ab)	(7,75 \pm 3,23a)	(41,74 \pm 9,16c)	(27,95 \pm 13,14b)
Superficie cubierta (%)	37,37 \pm 3,21ab	46,00 \pm 5,62a	30,02 \pm 8,23b	62,27 \pm 17,95c
Altura máxima (μm)	19,80 \pm 12,24a	23,67 \pm 9,16a	26,25 \pm 2,63a	25,67 \pm 9,37a
Rugosidad	0,4215 \pm 0,0895a	0,5470 \pm 0,1139b	0,4222 \pm 0,0785a	0,4936 \pm 0,0341ab

Para interpretación, ver Figura IV.1.

Figura IV.3. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los *biofilms* formados por *Salmonella Typhimurium* S175 en presencia de fosfato trisódico (CMI/2).



Biovolumen (μm^3) en el campo observado ($14.161 \mu\text{m}^2$)				
Total	$61.642,99 \pm 36.727,65a$	$104.609,40 \pm 45.704,66a$	$33.570,77 \pm 9.582,16a$	$238.457,59 \pm 158.632,34b$
Células vivas (verdes)	$50.960,48 \pm 31.183,51a$	$39.528,05 \pm 8.680,35a$	$23.912,63 \pm 9.559,86a$	$173.331,85 \pm 106.427,50b$
(porcentaje)	$(82,67 \pm 3,19a)$	$(37,79 \pm 13,54b)$	$(71,23 \pm 14,26a)$	$(72,69 \pm 6,60a)$
Células muertas (rojas)	$10.682,50 \pm 5.559,91a$	$65.081,35 \pm 40.332,67b$	$9.658,13 \pm 5.707,51a$	$65.125,74 \pm 52.646,53b$
(porcentaje)	$(17,32 \pm 3,19a)$	$(62,21 \pm 13,54b)$	$(28,77 \pm 14,26a)$	$(27,31 \pm 6,60a)$
Superficie cubierta (%)	$75,40 \pm 24,07a$	$94,08 \pm 3,35b$	$71,66 \pm 14,71a$	$97,22 \pm 5,65b$
Altura máxima (μm)	$30,17 \pm 10,74a$	$33,00 \pm 5,29a$	$25,17 \pm 5,19a$	$49,67 \pm 11,99b$
Rugosidad	$0,6377 \pm 0,1820a$	$0,5251 \pm 0,0430ab$	$0,6143 \pm 0,1764a$	$0,3904 \pm 0,1374b$

Para interpretación, ver Figura IV.1.

Figura IV.4. Proyecciones tridimensionales y parámetros estructurales de los *biofilms* formados por *Salmonella Typhimurium* S175 en presencia de hipoclorito sódico (CMI/2).

DISCUSIÓN

Adaptación a los biocidas

Las células de *Salmonella* experimentaron adaptación después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibidoras de CB o HIP. Estos hallazgos son coincidentes con observaciones anteriores relacionadas con otros géneros de bacterias (Dynes *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2014).

Arquitectura de los *biofilms*

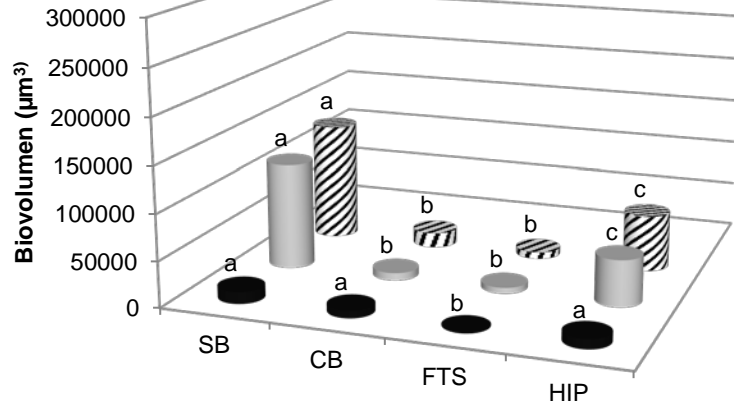
La formación de *biofilms* es un motivo importante de preocupación en el contexto de la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria, a la vez que supone un problema económico para las industrias de alimentos, debido a la posibilidad de contaminación cruzada y a la resistencia de las bacterias de los *biofilms* a múltiples situaciones de estrés diferentes. Aunque existen muchas fuentes de contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos, se ha demostrado que las biopelículas son el origen principal, habiéndose asociado estas estructuras con muchos brotes de enfermedad transmitida por alimentos (Wang *et al.*, 2013).

Hay una serie de circunstancias en las que las concentraciones de biocidas pueden estar presentes a niveles subinhibitorios (por ejemplo, uso inadecuado de los compuestos). En este contexto se investigó el efecto de concentraciones subinhibitorias de tres biocidas comúnmente utilizados en ambientes de procesamiento de alimentos (CB, FTS e HIP) sobre la capacidad de *S. Typhimurium* para formar *biofilm*. Para ello, se realizaron estudios por microscopía láser confocal de barrido con el objetivo de examinar la influencia de la adaptación previa y/o la exposición a concentraciones subinhibitorias de dichos compuestos sobre la arquitectura de los *biofilms* producidos *S. Typhimurium* S175.

En consonancia con trabajos previos (Díez-García *et al.*, 2012), este estudio demostró que *Salmonella Typhimurium* es capaz de producir *biofilms*. La cepa utilizada en la presente investigación mostró una fuerte capacidad para formar biopelículas, superando la habilidad de las cepas de este mismo serotipo ensayadas por otros autores (Bridier *et al.*, 2010).

Cultivo no expuesto

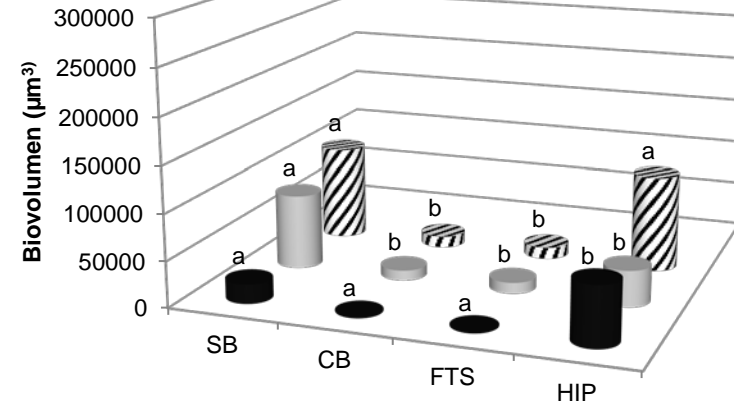
Gráfica A



Biofilm formado en presencia (CMI/2) de

Cultivo previamente expuesto a CB¹

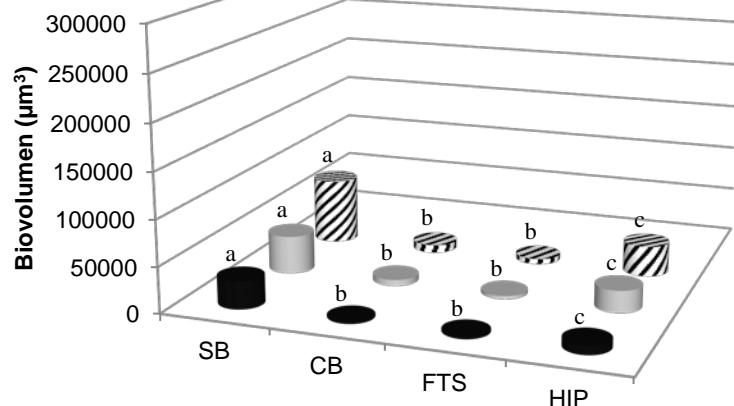
Gráfica B



Biofilm formado en presencia (CMI/2) de

Cultivo previamente expuesto a FTS¹

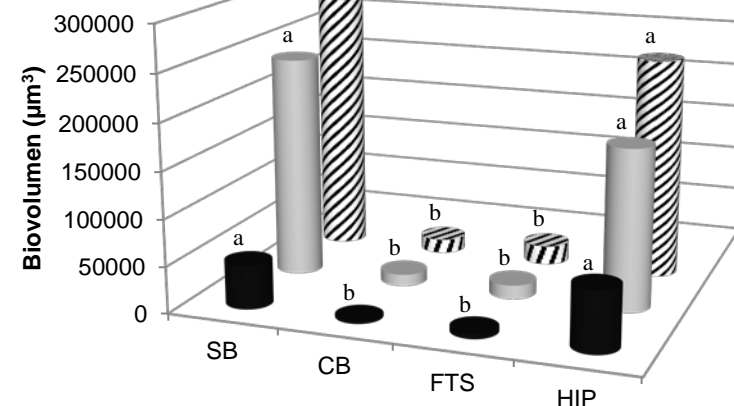
Gráfica C



Biofilm formado en presencia (CMI/2) de

Cultivo previamente expuesto a HIP¹

Gráfica D



Biofilm formado en presencia (CMI/2) de

■ Células muertas ■ Células vivas ▨ Células totales

¹, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas: SB, sin biocida; CB, cloruro de benzalconio; FTS, fosfato trisódico; HIP, hipoclorito sódico. Los datos son los valores medios de nueve determinaciones. Las columnas en una gráfica (A, B, C o D) para el mismo estado fisiológico (células muertas, células vivas o células totales), que no comparten ninguna letra son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura IV.5. Biovolumen de los *biofilms* formados por células de *Salmonella* Typhimurium S175 no expuestas a biocidas (gráfica A) o previamente expuestas a cloruro de benzalconio (gráfica B), fosfato trisódico (gráfica C) o hipoclorito sódico (gráfica D).

Tal y como había sido puesto de manifiesto anteriormente para otras bacterias (Capita *et al.*, 2014), se observaron variaciones en la estructura tridimensional de los *biofilms* de *Salmonella* dependiendo del compuesto con el que habían estado en contacto. El presente estudio proporciona la evidencia clara de que la adaptación previa a HIP aumenta significativamente la capacidad de *S. Typhimurium* para formar *biofilms*, especialmente cuando dichas estructuras se forman en presencia de HIP o en ausencia de biocidas. Este fenómeno puede tener efectos perjudiciales, ya que la formación de biopelículas desempeña un papel importante en la persistencia bacteriana. Se ha demostrado que las modificaciones en la hidrofobicidad de la superficie celular, los cambios en la matriz extracelular o la expresión aumentada de genes específicos que codifican para adhesinas de superficie celular o que están implicados en el *quorum sensing*, son responsables de incrementar la formación de *biofilm* en presencia de concentraciones subinhibitorias de biocidas (Dynes *et al.*, 2009). Este es, aparentemente, el primer trabajo sobre el efecto de concentraciones subinhibitorias de HIP en los *biofilms* de *S. Typhimurium*. Se necesitan nuevos estudios para caracterizar el mecanismo exacto responsable de aumentar la formación de *biofilm* en estas bacterias después de la adaptación al HIP.

La formación de *biofilm* más eficiente en cultivos adaptados y no adaptados se observó en el caso de las células crecidas en ausencia de biocidas o en presencia de concentraciones subinhibitorias de HIP. Estos hallazgos, que reflejan la incapacidad del HIP a dosis subinhibitorias para evitar la formación de *biofilms* por *Salmonella*, son consistentes con los resultados de otros autores, quienes observaron que las dosis de HIP por debajo de la CMI estimulan la formación de *biofilm* por varias especies bacterianas, incluyendo *Salmonella* (Ebrahimi *et al.*, 2015). Por el contrario, el crecimiento en presencia de concentraciones subinhibitorias de CB o FTS disminuyó la capacidad de la cepa S175 para formar *biofilm*, aunque la formación de *biofilm* no se evitó completamente. El reducido biovolumen de los *biofilms* expuestos a concentraciones subinhibitorias de CB o FTS sugiere que ambos agentes son de alguna manera capaces de inhibir la multiplicación bacteriana, la adhesión, o ambos. Estos resultados muestran que el CB y el FTS podrían contribuir a controlar la formación de *biofilm* incluso a concentraciones inferiores a la CMI. Las diferencias observadas entre los biocidas pueden estar relacionadas con sus diferentes mecanismos de acción. Así, el CB actúa desorganizando las bicapas de la membrana lipídica. Las soluciones de FTS son fuertemente alcalinas y sus mecanismos de acción incluyen la disgregación de

las bicapas lipídicas y la materia orgánica, así como la modificación de la fuerza iónica. Por su parte, el HIP actúa generando radicales de oxígeno, que son bactericidas a través de la interacción inespecífica con moléculas orgánicas (Alonso-Hernando *et al.*, 2013; Corcoran *et al.*, 2014).

Determinación de la viabilidad del *biofilm*

La viabilidad microbiana es una preocupación común en casi todos los procesos que involucran microorganismos. La tinción con el *kit* LIVE/DEAD[®], que emplea los colorantes fluorescentes SYTO9 y yoduro de propidio (YP) se ha usado ampliamente como un indicador de viabilidad celular, permitiendo determinar la integridad de las cubiertas celulares en muchas poblaciones bacterianas, incluyendo las células asociadas a *biofilms* (Cerca *et al.*, 2005). Estos colorantes han sido empleados con anterioridad para evaluar la susceptibilidad de las bacterias a diferentes biocidas. En el presente estudio se estudiaron las biopelículas de *S. Typhimurium* de veinticuatro horas, formadas por células sometidas a diferentes condiciones (previamente adaptadas y/o expuestas a los biocidas); los *biofilms* se analizaron mediante CLSM después de tinción con SYTO9 y YP. Estos fluorocromos difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad para penetrar en las células bacterianas vivas y unirse a los ácidos nucleicos. El colorante fluorescente verde SYTO9 es esencialmente no fluorescente hasta que se une al ADN, momento en que su fluorescencia se multiplica por 1.000. Este colorante es capaz de penetrar en las células bacterianas vivas y muertas y su afinidad por los ácidos nucleicos es moderada. Por su parte, el colorante fluorescente rojo yoduro de propidio sólo penetra en las células que presentan soluciones de continuidad en sus membranas y generalmente no está en las células viables. Cuando ambos colorantes están presentes, el yoduro de propidio exhibe una mayor afinidad por los ácidos nucleicos que el SYTO9, desplazando a este último compuesto, dando como resultado fluorescencia roja. Así, con una mezcla apropiada de los colorantes SYTO9 y YP, las bacterias con membranas celulares intactas emiten fluorescencia verde, mientras que las bacterias con membranas dañadas emiten fluorescencia roja. El yoduro de propidio aumenta su fluorescencia únicamente 20 ó 30 veces al unirse al ADN, lo que conduce a una fluorescencia de fondo potencialmente alta (Biggerstaff *et al.*, 2006).

Los análisis cuantitativos de la viabilidad bacteriana de las biopelículas han sido realizados en escasas ocasiones (Fernández-Barat *et al.*, 2012). Así, la presente investigación es probablemente la primera en examinar el efecto de concentraciones

subinhibitorias de CB, FTS e HIP en la viabilidad de los *biofilms* de *S. Typhimurium*. El bajo porcentaje (aproximadamente 20%) de las células teñidas con YP en los *biofilms* formados en presencia de biocidas indica que la membrana celular de la mayoría de las células no se ha visto comprometida. Sin embargo, el bajo biovolumen observado en presencia de CB o FTS, en comparación con los cultivos control (cultivos no expuestos), indica una capacidad reducida para formar *biofilm* en presencia de estos biocidas. En presencia de antimicrobianos, las bacterias pueden entrar en un estado latente, en el que las células bacterianas no están inactivadas, pero tampoco se multiplican (Puga *et al.*, 2016). Este hecho puede explicar la pequeña cantidad de *biofilm* y el bajo porcentaje de células muertas en presencia de concentraciones subinhibitorias de CB o FTS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2013). Effectiveness of several chemical decontamination treatments against Gram-negative bacteria on poultry during storage under different simulated cold chain disruptions. *Food Control* **34** (2), 574-580.
- Biggerstaff, J.P., Le Puil, M., Weidow, B.L., Prater, J., Glass, K., Radosevich, M., White, D.C. (2006). New methodology for viability testing in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes* **20** (2), 141-16.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods* **82** (1), 64-70.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1366-1375.
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 1268-1280.
- CDC -Centers for Disease Control and Prevention- (2014). *Foodborne diseases active surveillance network (FoodNet): FoodNet surveillance report for 2012 (final report)*. CDC, Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia.
- Cerca, N., Martins, S., Sillankorva, S., Jefferson, K. K., Pier, G. B., Oliveira, R., Azeredo, J. (2005). Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacilin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (12), 8677-8682.
- CLSI -Clinical and Laboratory Standards Institute- (2013). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals*, 4th ed. Approved standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., Cormican, M. (2014). Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and Environmental Microbiology* **80** (4), 1507-1514.
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31**, 173-180.
- Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Korber, D. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., Hitchcock, A. P. (2009). Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Canadian Journal of Microbiology* **55**, 163-178.
- Ebrahimi, A., Hemati, M., Shabanpour, Z., Dehkordi, S. H., Bahadoran, S., Lotfalian, S., Khubani, S. (2015). Effects of benzalkonium chloride on planktonic growth and biofilm formation by animal bacterial pathogens. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* **8**, e16058.
- EFSA-ECDC –European Food Safety Authority-European Centre for Disease Prevention and Control- (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* **14**, 4634-4864.
- Fernández-Barat, L., Li Bassi, G., Ferrer, M., Bosch, A., Calvo, M., Vila, J., Gabarrús, A., Martínez-Olondris, P., Rigol, M., Esperatti, M., Luque, N., Torres, A. (2012). Direct analysis of bacterial viability in endotracheal tube biofilm from a pig model of methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* pneumonia following antimicrobial therapy. *FEMS Immunology Medical Microbiology* **65**, 309-317.
- Houari, A., Di Martino, P. (2007). Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 652-656.
- Luther, M. K., Bilida, S., Mermel, L. A., LaPlante, K. L. (2015). Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Infectious Diseases Therapy* **4**, 219-226.
- Miladi, H., Mili, D., Slama, R.B., Zouari, S., Ammar, E., Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three Mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis* **93**, 22-31.
- Nguyen, H. D. N., Yang, Y. S., Yuk, H. G. (2014). Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT - Food Science and Technology* **55**, 383-388.
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. (2014). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **189**, 106-112.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science and Technology* **19** (3), 131-144.
- Puga, C. H., SanJosé, C., Orgaz, B. (2016). Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control* **65**, 143-151.
- Redelman, C. V., Maduakolam, C., Anderson, G. G. (2012). Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. *FEMS Immunology Medical Microbiology* **66**, 411-418.
- Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., Ren, Q. (2015). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology* **15**, 36.
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G. (2013). In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology* **167** (3), 293-302.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. Los preparados de carne de pollo son alimentos de dudosa calidad higiénico-sanitaria, además de suponer un importante reservorio de cepas de *Staphylococcus aureus* con múltiples resistencias a antibióticos de importancia clínica. Estos hechos, preocupantes en el contexto de la Seguridad Alimentaria, subrayan la necesidad de que los manipuladores de dichos alimentos reciban una buena formación en el campo de la higiene alimentaria, con el objetivo de evitar malas prácticas (p. ej. contaminación cruzada o insuficiente cocinado) y reducir así el riesgo para el consumidor.

SEGUNDA. La mayor prevalencia de resistencia que se observó en preparados de carne de pollo para los grupos de antibióticos más frecuentemente utilizados en las explotaciones avícolas sugiere una relación entre el uso de antimicrobianos y la emergencia de cepas resistentes. En este sentido se destaca la necesidad de un uso prudente de los antibióticos en producción animal.

TERCERA. Los resultados obtenidos sugieren la importancia de los preparados cárnicos (de mamíferos y aves) como un reservorio de cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) con resistencia a un amplio rango de antibióticos, y su potencialidad para transferirse a los seres humanos a través de la manipulación, la contaminación cruzada o el consumo de alimentos insuficientemente cocinados. Estos hallazgos son de utilidad para mejorar el conocimiento sobre la prevalencia y la resistencia a antibióticos de MRS en los alimentos, de gran interés en los estudios epidemiológicos. No obstante, se requieren más investigaciones para determinar el impacto real que tiene la presencia de MRS en preparados cárnicos sobre la Salud Pública.

CUARTA. En comparación con el método convencional de difusión por disco, el sistema miniaturizado disponible comercialmente *Sensi Test Gram-positive* es técnicamente simple y permite realizar antibiogramas en un tiempo reducido. Se observó una concordancia sustancial entre el método convencional y el sistema miniaturizado por lo que respecta a la detección de resistencia a antibióticos de MRS. Es especialmente destacable la elevada sensibilidad (capacidad para detectar aislamientos resistentes) del sistema miniaturizado.

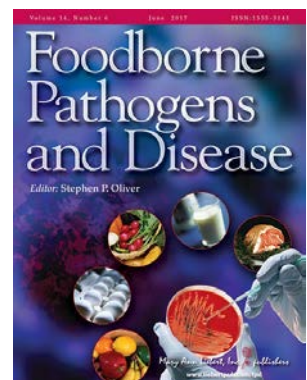
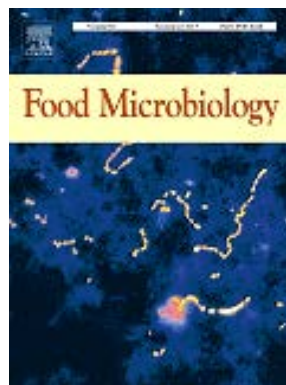
QUINTA. Las células de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium son capaces de formar *biofilms* compactos mediante la construcción de una estructura tridimensional con múltiples capas de células. La arquitectura y topografía de estos *biofilms* varía sustancialmente en respuesta al contacto con diferentes desinfectantes. El contacto con concentraciones subinhibitorias de cloruro de benzalconio o fosfato trisódico reduce la capacidad de MRSA y de *S. Typhimurium* para formar *biofilm*, lo que sugiere que estos compuestos tienen propiedades antibiofilm incluso a bajas concentraciones. Por el contrario, la presencia de concentraciones subinhibitorias de hipoclorito sódico puede mejorar la capacidad de ambos microorganismos para producir *biofilm*.

SEXTA. La formación de *biofilms* inducida por el hipoclorito sódico puede tener implicaciones importantes para la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria, dada la gran resistencia de las células sésiles a diferentes factores de estrés y, por consiguiente, su dificultad de eliminación. Se pone así de relieve la importancia de que los desinfectantes se utilicen de forma adecuada para evitar concentraciones subletales, las cuales podrían mejorar la capacidad de las bacterias para formar *biofilm*.

SÉPTIMA. Sería conveniente realizar estudios adicionales que permitan aclarar los mecanismos a través de los cuales el contacto con hipoclorito sódico puede incrementar la capacidad de las bacterias para formar *biofilm*. La identificación de la causa, o causas, de este fenómeno sería de utilidad para obtener una mejor comprensión del proceso de formación de los *biofilms* y poder así combatirlos de manera más eficaz.

ANEXO I

PUBLICACIONES



PRIMERA PUBLICACIÓN

Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2017). Microbial loads and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in different types of raw poultry-based meat preparations. *Poultry Science*, in press, <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex200>.

Microbial loads and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in different types of raw poultry-based meat preparations

Laura Buzón-Durán^{1,2}, Rosa Capita^{1,2}, Carlos Alonso-Calleja^{1,2*}

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

² Institute of Food Science and Technology, University of León, E-24071 León, Spain.

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

ABSTRACT

The hygiene status of raw chicken-meat preparations from retail outlets in North-Western Spain was investigated. Microbial counts (aerobic plate counts -APCs-, psychrotrophs, *Enterobacteriaceae*, faecal coliforms, enterococci, pseudomonads, fluorescent pseudomonads, yeasts and moulds, and *Staphylococcus aureus*) were determined for minced meat, hamburgers, nuggets, white sausages, red sausages, escalope and roll-ups. *S. aureus* isolates were tested for susceptibility to twenty antimicrobials of veterinary and human clinical significance (disc diffusion method, CLSI). Average microbial loads (\log_{10} CFU/g) ranged from 2.63 ± 0.80 (enterococci) to 6.66 ± 1.09 (psychrotrophs). Average APCs ($6.44 \pm 1.16 \log_{10}$ CFU/g) were regarded as acceptable according to E.U. microbiological criteria. The type of product had an influence ($P < 0.05$) on microbial loads, samples of escalope showing the highest counts for most microbial groups. Two-thirds (66.7%) of the samples tested harboured *S. aureus*. All the *S. aureus* isolates were multi-resistant (to between three and fifteen antibiotics). The greatest prevalence of resistance was shown for ampicillin, oxacillin, penicillin G, ceftazidime, and nalidixic acid. The results of this study show that poultry-based meat preparations present high microbial loads and are a major reservoir of antibiotic-resistant *S. aureus* strains. This highlights the need for correct handling of such foodstuffs with a view to reducing risks to consumers.

KEY WORDS: chicken-meat preparations, microbiological quality, *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance.

INTRODUCTION

Chicken is the most widely consumed meat in Spain. The annual per capita consumption in 2015 was 13.78 kg, and represented 37.1% of the total volume of fresh meat (MAGRAMA, 2016). Worldwide, chicken is the second most widely eaten meat, at 14.99 kg per capita per year, exceeded only by pork, at 16.02 kg per capita per year (FAO, 2017). This high level of consumption of chicken is because it is an inexpensive foodstuff, is easily cooked, is rated highly for its sensory qualities, is perceived as nourishing and healthy, and is accepted by almost all cultures and religions. Moreover, it lends itself well to food technologies with the possibility of processing it to meet the demands of consumers, who increasingly want ready-to-cook meat products (e.g. meat preparations), because saving time during food preparation has become a priority for most families (Selvan et al., 2007).

Contamination of chicken by pathogenic microorganisms is a worldwide concern. Poultry meat and products thereof were responsible for at least 9.5% of reported foodborne outbreaks in the European Union in 2015 (EFSA-ECDC, 2016). Furthermore, the presence of spoilage microorganisms is also a major problem because of the financial losses it entails. Aerobic plate counts (APCs),

psychrotrophs, *Enterobacteriaceae*, faecal coliforms, enterococci, pseudomonads, fluorescent pseudomonads, and yeast and moulds have been used in order to assess microbiological safety, the sanitation conditions during processing and the keeping quality of poultry products (Álvarez-Astorga et al., 2002; Del Río et al., 2007).

Staphylococcus aureus is recognized as the causative agent for staphylococcal food poisoning, a form of gastro-enteritis that arises from ingesting one or more preformed staphylococcal enterotoxins (Seok and Bohach, 2007). In 2015, 434 foodborne outbreaks (9.9% of total) were caused by staphylococcal toxins in the European Union. Meat and poultry products are among the main food vectors involved in these outbreaks (EFSA-ECDC, 2016). In addition, *S. aureus* is a major cause of infections in humans. The transmission of *S. aureus* may occasionally occur in the community through the eating or handling of contaminated foods, and serious foodborne infections by this bacterium have been formally demonstrated for years in previously healthy persons (Capita and Alonso-Calleja, 2013; Buzón-Durán et al., 2017).

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 foodborne pathogens to human populations. Moreover, antimicrobial-resistant bacteria may represent a reservoir of resistance genes transferable to pathogenic or commensal bacteria in the food chain (Capita and Alonso-Calleja, 2013). Monitoring resistance to antibiotics is essential in order to gather information about the size and trend of this problem, as well also to plan and check the effectiveness of control measures introduced. However, there is only very limited information about the antibiotic resistance of *S. aureus* strains found in meat and poultry, and products thereof. It would appear that investigations of such matters are lacking in Spain.

The aims of this work were to know the microbiological quality of a range of prepared poultry products in North-Western Spain and to determine the patterns of resistance to antibiotics of the strains of *S. aureus* isolated from these foodstuffs.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A total of thirty samples of chicken-based preparations were sampled. They were obtained on the day of processing or within three days thereafter (Days 0 to 3) from several retail establishments in Spain

(three supermarkets, three butcher shops and a poulterer's shop) in the City of León in North-Western. The samples comprised: minced meat (five samples), hamburgers (eight), nuggets (three), white sausages (five), red sausages (five), escalope (two) and roll-ups made of chicken breast, cooked ham and cheese (two). All of the samples, each weighed about 300 g, were put in their own separate sterile plastic bags, transported to the laboratory immediately after collection in an ice chest and tested at once upon arrival or within four hours being stored at $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ if the analysis was not immediate.

Microbiological analysis

Sub-samples each weighing 10 g were taken and homogenized for two minutes in a Masticator (IUL, Barcelona, Spain) with 90 ml of 0.1% peptone water (Oxoid Ltd., Hampshire, UK). In the case of hamburgers, nuggets, sausages, escalope and roll-ups, these ten-gram samples comprised two or more pieces taken from different parts of the main sample. Decimal dilutions were performed using the same diluent. Details of the culture media (all from Oxoid) and incubation parameters used are shown in Table 1. Duplicate plates were incubated under aerobic conditions. *Pseudomonas fluorescens* colonies grown on *Pseudomonas* CFC medium were counted under an ultraviolet lamp (254 nm; Palleroni, 1984).

Table 1. Culture media, incubation times, temperatures and references for microbiological analysis.

Microbial group	Culture media ⁴	Incubation		Reference
		T ^a (°C)	Time	
Aerobic plate counts ¹	PCA	30	72 h	Jay (2002)
Psychrotrophs ¹	PCA	7	10 d	Cousin <i>et al.</i> (2001)
<i>Enterobacteriaceae</i> ^{2, 3}	VRBGA	35	24 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
Faecal coliforms ^{2, 3}	VRBA	45	24 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
Enterococci ²	KAA	42	24 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
<i>Pseudomonas</i> spp. ¹	CFC	25	48 h	Baird <i>et al.</i> (1987)
Yeast and moulds ¹	OGYEA	25	5 d	Baird <i>et al.</i> (1987)
<i>Staphylococcus aureus</i> ¹	BP	35	48 h	Lancette and Tatini (1992)

¹ spread-plate technique (0.1 ml); ² pour-plate technique (1 ml); ³ with overlay; ⁴ PCA, plate count agar; VRBGA, violet red bile glucose agar; VRBA, violet red bile agar; KAA, kanamycin aesculin azide agar; *Pseudomonas* agar with cephaloridine, fucidin and cetricimide (CFC) supplement; OGYEA, oxytetracycline glucose yeast extract agar; BP, Baird-Parker agar with egg-yolk tellurite emulsion.

For each sample, from one to five colonies with the morphology typical of *S. aureus* (grey-black shiny colonies surrounded by an opaque halo) were isolated from Baird-Parker agar plates and identified on the basis of Gram staining, catalase production and oxidase activity. Catalase-positive, oxidase-negative, Gram-positive cocci were inoculated into microtubes of API STAPH (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) in accordance with the manufacturer's instructions. Data interpretation was undertaken using the Analytical Profile Index (API) database (V7.0) with the apiweb™ identification

software (bioMérieux). Only one *S. aureus* isolate per positive sample was further studied by means of the tests listed below.

3. Antimicrobial susceptibility testing

S. aureus isolates were screened for susceptibility to a panel of twenty antimicrobials on Mueller-Hinton agar (Oxoid) by a disc diffusion method (CLSI, 2013). The following discs were used: amikacin (AK; 30 µg), gentamicin (CN; 10 µg), tobramycin (TOB; 10 µg), streptomycin (S; 10 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), oxacillin (OX; 1 µg), penicillin G (P; 10 units), cefazolin (KZ; 30 µg), ceftazidime (CAZ; 30 µg),

imipenem (IMP; 10 µg), sulphamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg), teicoplanin (TEC; 30 µg), vancomycin (VA; 30 µg), erythromycin (E; 15 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), tetracycline (TE; 30 µg), and rifampicin (RD; 5 µg). All the antibiotic discs were obtained from Oxoid. *S. aureus* ATCC 29213 was used as a reference strain for antibiotic disc control. After incubation at 35 °C for 18-24 hours, the inhibition zones were measured and scored as sensitive, intermediate susceptibility and resistant in accordance with CLSI guidelines.

Statistical analysis

Microbial counts were converted into \log_{10} CFU/g. The data were analysed using analysis of variance (ANOVA) techniques, with Duncan's Multiple Range Test used for separating means. The figures for prevalence of resistance to antibiotics were compared by means of Chi-Squared and Fisher's Exact Tests. Significant differences were established at a 5% probability level ($P < 0.05$). All statistical tests were performed using the software package Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, U.S.A.).

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological quality

The microbial loads on chicken preparations can be seen in Table 2.

Average counts varied between $2.63 \pm 0.80 \log_{10}$ CFU/g (enterococci) and $6.66 \pm 1.09 \log_{10}$ CFU/g (psychrotrophs). Significant differences ($P < 0.05$) were observed between sample types for all microbial groups other than enterobacteria and faecal coliforms. It is striking that particularly high levels of aerobic plate counts (APCs), psychrotrophs, *Pseudomonas*, moulds and yeasts, and *S. aureus* were observed in the escalope samples.

APCs averaged $6.44 \pm 1.16 \log_{10}$ CFU/g. This is higher than counts found previously in Spain for chicken carcasses ($5.19 \pm 0.43 \log_{10}$ CFU/g; Capita et al., 2002) and for chicken legs ($5.10 \pm 0.59 \log_{10}$ CFU/g to $5.79 \pm 0.64 \log_{10}$ CFU/g; Álvarez-Astorga et al., 2002; Del Río et al., 2007). The higher levels of APCs observed in chicken-meat preparations, relative to carcasses and to legs, are probably due to contamination occurred during processing. Our results fall within the range of counts (\log_{10} CFU/g) recorded for poultry preparations from retail outlets, both in Spain (6.29 ± 0.64 to 7.28 ± 0.51 ; Álvarez-Astorga et al., 2002) and elsewhere (6.05 ± 0.18 ; Lerasle et al., 2014).

A three-class plan is currently applied in the European Union ($n = 5$, $c = 2$, $m = 5.70 \log_{10}$ CFU/g and $M = 6.70 \log_{10}$ CFU/g) for APCs in minced meat at the end of manufacturing process (OJEU, 2005).

Results are satisfactory if all the values (n) observed are lower than m , acceptable if a maximum of c values are between m and M , and the rest of the values observed are lower than m , and unsatisfactory if one or more of the values observed are higher than M or more than c values are between m and M . Average APCs falling between “ m ” and “ M ” (acceptable) were observed in the work being presented here. In addition to legal requirements, guidelines and recommendations have been developed to monitor the microbiological quality of meat (IFST, 1997; ICMSF, 2011). APCs in the present work are not in line with these international guidelines of Good Manufacturing Practice (GMP; $5 \log_{10}$ CFU/g) and are close to or above the maximum acceptable level ($7 \log_{10}$ CFU/g). Loads higher than $7 \log_{10}$ CFU per gram or cm^2 are generally associated with incipient changes in sensory impact (ICMSF, 1986). It should be pointed out, however, that the criteria quoted refer to meat preparations at the end of the manufacturing process, whilst in the work being presented here samples were analysed sometime after processing (up to three days). During the time spent in refrigerated storage, the levels of aerobic bacteria are likely to have increased relative to initial counts, as previously reported (Del Río et al., 2007).

The average counts of psychrotrophs observed in our research ($6.66 \pm 1.09 \log_{10}$

CFU/g) are higher than those previously found for chicken carcasses, at $4.84 \pm 0.60 \log_{10}$ CFU/g (Capita et al., 2001), and chicken legs (between 4.34 ± 0.77 and $7.07 \pm 1.07 \log_{10}$ CFU/g; Álvarez-Astorga et al., 2002; Del Río et al., 2007). All the samples in the present study also exceeded the maximum guideline limit set by Pascual-Anderson (1992) for dressed poultry in Spain, which was $5 \log_{10}$ CFU/g. On the other hand, the results of this study do fall within the wide range of values (between 3.5 and $10.7 \log_{10}$ CFU/g) recorded by other authors (Gashe and Mpuchane, 2000) for poultry by-products (including minced meat).

None of the samples investigated showed any sign of sensory changes, even though some were contaminated with more than $8 \log_{10}$ CFU/g of psychrotrophs. These results are in agreement with the findings of El-Leithy and Rashad (1989). In contrast, Dainty and Mackey (1992) noted that levels of psychrotrophs between 6 and $8 \log_{10}$ CFU/g were enough to affect the smell and appearance of meat.

Table 2. Microbial counts (\log_{10} CFU/g; mean \pm STD) in raw poultry-based meat preparations.

Type of sample	Microbial group								
	Aerobic plate counts	Psychrotrophs	Enterobacteria	Faecal coliforms	Enterococci	<i>Pseudomonas</i>	Fluorescent <i>Pseudomonas</i>	Yeast and moulds	<i>S. aureus</i> ¹
Minced meat	6.46 \pm 1.08ab	6.25 \pm 0.83a	2.99 \pm 0.94a	2.97 \pm 0.53a	1.98 \pm 1.07a	5.50 \pm 1.26a	3.63 \pm 0.81a	5.43 \pm 1.28ab	3.99 \pm 1.05abc
Hamburger	6.78 \pm 0.86ab	7.26 \pm 0.71ab	3.01 \pm 0.72a	3.08 \pm 0.77a	2.61 \pm 0.95ab	5.17 \pm 0.91a	3.30 \pm 1.00ab	5.75 \pm 0.84ab	3.85 \pm 0.74abc
<i>Nuggets</i>	6.80 \pm 1.82ab	6.88 \pm 2.00a	2.32 \pm 0.81a	2.07 \pm 0.72a	2.50 \pm 0.45ab	5.14 \pm 1.42a	2.10 \pm 0.17b	5.43 \pm 1.25ab	3.54 \pm 0.83ab
White sausages	5.90 \pm 1.01a	5.99 \pm 0.97a	2.91 \pm 0.93a	2.98 \pm 0.85a	2.58 \pm 0.21ab	4.78 \pm 0.41a	3.29 \pm 0.83ab	5.49 \pm 1.05ab	3.39 \pm 0.34a
Red sausages	5.82 \pm 1.00a	6.50 \pm 0.88a	2.86 \pm 0.59a	2.62 \pm 0.37a	2.77 \pm 0.57ab	5.00 \pm 0.43a	3.68 \pm 0.91a	5.72 \pm 0.76ab	4.43 \pm 0.70bc
Escalope	7.90 \pm 0.93b	8.27 \pm 0.65b	3.00 \pm 1.07a	3.06 \pm 1.20a	2.99 \pm 0.23ab	7.05 \pm 0.67b	2.15 \pm 0.21b	6.56 \pm 0.22a	4.69 \pm 0.46c
Roll-ups	6.50 \pm 1.66ab	6.83 \pm 1.32a	2.68 \pm 0.80a	2.77 \pm 0.88a	3.47 \pm 0.74b	6.06 \pm 1.34ab	2.63 \pm 0.46ab	5.07 \pm 0.69b	4.67 \pm 0.25c
Average	6.44 \pm 1.16	6.66 \pm 1.09	2.89 \pm 0.77	2.86 \pm 0.76	2.63 \pm 0.80	5.24 \pm 0.99	3.13 \pm 0.91	5.61 \pm 0.96	4.07 \pm 0.80

Data in the same column with no letters in common are significantly different ($P < 0.05$). ¹, only positive samples (66.7%) were considered.

Enterobacteriaceae and fecal coliforms loads have been used as an indicator of faecal contamination in fresh meat (Capita et al., 2002). The average counts for enterobacteria in this study ($2.89 \pm 0.77 \log_{10}$ CFU/g) were above the limits of the microbiological criteria established for poultry in Spain, which are $2 \log_{10}$ CFU/g (Pascual-Anderson, 1992).

Faecal coliform loads found in this piece of research, at $2.86 \pm 0.76 \log_{10}$ CFU/g, were similar to those observed by Del Río et al. (2007) for chicken legs immediately after slaughtering ($2.86 \pm 0.58 \log_{10}$ CFU/g on skin), and to those noted in previous work with chicken carcasses in retail outlets ($2.73 \pm 0.29 \log_{10}$ CFU/g; Capita et al., 2002). Levels of contamination found by other authors varied from 1.71 ± 0.29 (Álvarez-Fernández et al., 2013) to $4.1 \log_{10}$ CFU/g (Abu-Ruwaida et al., 1994). This wide range of values may be due to differences in the analytic techniques used. Thus, in a previous research (Capita et al., 2002) it was noted that the counts of coliforms in chicken meat were $2.73 \pm 0.29 \log_{10}$ CFU/g when the standard violet red bile agar (VRBA) method (also employed in the present work) was used, but $3.38 \pm 0.77 \log_{10}$ CFU/g when the Hydrophobic Grid Membrane Filter method (Iso-Grid HGMF™; QA Lab, San Diego, California) was used.

Counts for enterococci observed in the present work ($2.63 \pm 0.80 \log_{10}$ CFU/g) were very similar to those previously found in poultry (Del Río et al., 2007), at $2.88 \pm 0.48 \log_{10}$ CFU/g. In addition to their role as indicator microorganisms, enterococci are responsible for human infections, and generally show multiple resistances to clinically important antibiotics (Guerrero-Ramos et al., 2016). Indeed, they are considered “sentinel” microorganisms for antibiotic resistance (Capita and Alonso-Calleja, 2013).

The average counts for *Pseudomonas* found in chicken preparations ($5.24 \pm 0.99 \log_{10}$ CFU/g), were higher than levels previously observed in poultry (from $4.11 \pm 0.83 \log_{10}$ CFU/g to $4.70 \pm 0.92 \log_{10}$ CFU/g; Capita et al., 2001; Del Río et al., 2007). These values are lower than those that trigger sensory changes (such as variations in colour, unpleasant smell or formation of a surface deposit), which range from 7 to $8 \log_{10}$ CFU/g (Gallo et al., 1988).

Over recent years increasing attention has been paid to fluorescent pseudomonads, in view of the great ability to grow at refrigeration temperatures and of the fact that they are the bacteria chiefly responsible for the final stages of spoilage of meat (Capita et al., 2001). The average counts for fluorescent pseudomonads in the present study ($3.13 \pm 0.91 \log_{10}$ CFU/g)

were lower than those noted by Gennari and Dragotto (1992), who stated that the normal levels of these microorganisms in poultry range from 4 to 6 log₁₀ CFU/g.

With regard to the mould and yeast group, this study revealed average levels of 5.61 ± 0.96 log₁₀ CFU/g. These values can be considered high in comparison with earlier results for poultry: 2.99 ± 0.83 log₁₀ CFU/g (Capita et al., 2001), and 3.96 ± 0.47 log₁₀ CFU/g (Del Río et al., 2007).

A total of twenty *S. aureus* strains were isolated from twenty samples (minced meat, hamburgers, and sausages). This prevalence (66.7%) falls within the range of values recorded in other studies of poultry meat and products thereof, which are very variable, ranging from 3% (Osman et al., 2016) to 100% (Capita et al., 2001; Del Río et al., 2007).

Average counts for *S. aureus* in the present work, calculated with only positive samples being considered, were 4.07 ± 0.80 log₁₀ CFU/g. These levels are within the wide range of values obtained by other authors, which run from below 3 to above 5 log₁₀ CFU/g or cm² (Waldroup, 1996).

In Spain, the recommended upper limit for enterotoxinogenic *S. aureus* counts in dressed chickens is 2 log₁₀ CFU/g (Pascual-Anderson, 1992). In France there is a guideline (CNERNA-CNRS, 1996) involving a three-class plan (n = 5, c = 2, m

= 10³ CFU/g, and M = 10⁴ CFU/g). Another microbiological criterion requires absence in 25 grams of sample (Wehr, 1982). Taking into account all these microbiological criteria, the counts for *S. aureus* observed in the current research were unacceptably high.

Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates

A total of 20 *S. aureus* isolates were screened for susceptibility to a panel of twenty antimicrobial compounds of veterinary and human clinical significance. The number of antibiotics to which the strains were resistant is shown in Figure 1. On average, the number of resistances per strain was 6.35. The presence of bacteria with multiple resistances to antibiotics of clinical importance has previously been observed in poultry meat (Alonso-Hernando et al., 2012; Álvarez-Fernández et al., 2012). This implies a crucial challenge for public health, as many antimicrobials are invalidated as therapeutic options.

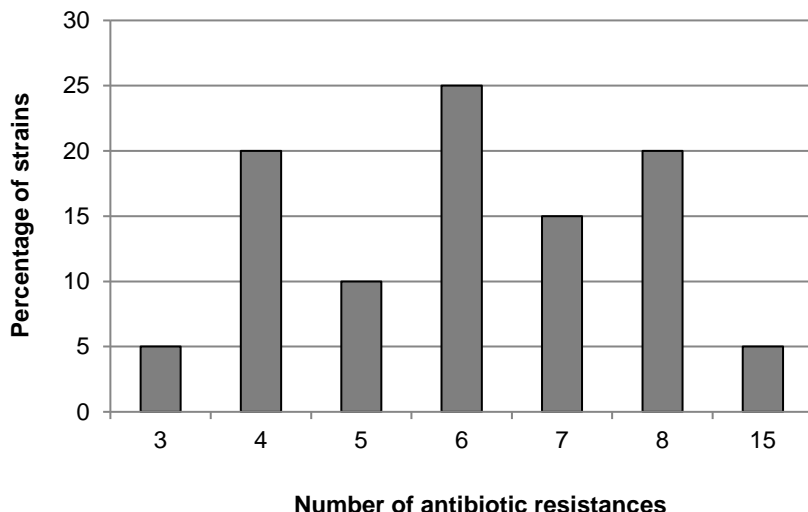
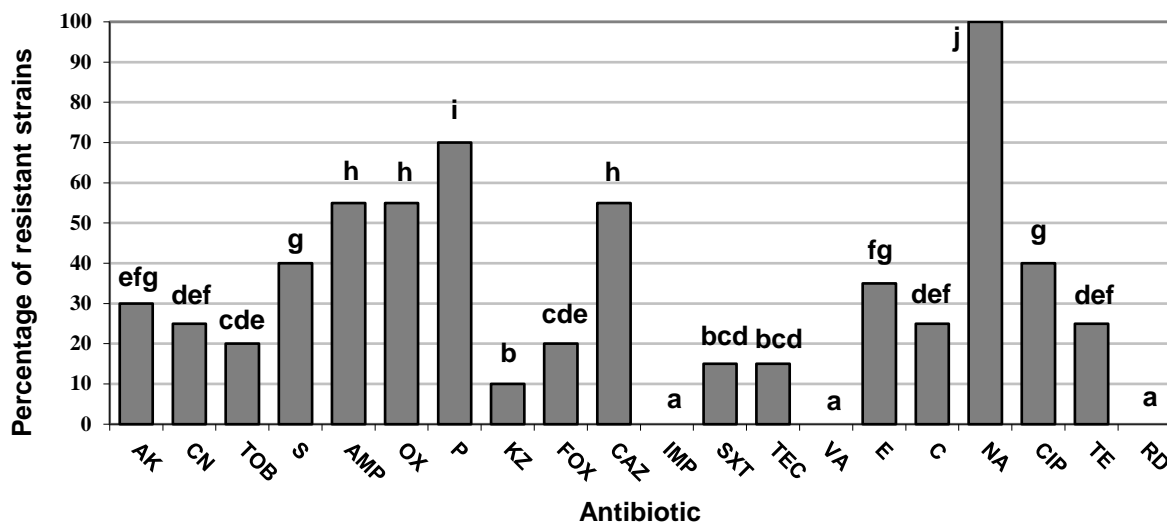


Figure 1. Distribution of the *S. aureus* isolates from poultry-based meat preparations in accordance with the number of antibiotic resistances.

Figure 2 shows the percentages of strains resistant to each of the antimicrobials examined. There were wide differences between substances, with no resistance to imipenem, vancomycin or rifampicin.



AK, amikacin (30 µg); CN, gentamicin (10 µg); TOB, tobramycin (10 µg); S, streptomycin (10 µg); AMP, ampicillin (10 µg); OX, oxacillin (1 µg); P, penicillin G (10 units); KZ, cefazolin (30 µg); FOX, ceftaxime (30 µg); CAZ, ceftazidime (30 µg); IMP, imipenem (10 µg); SXT, sulphamethoxazole-trimethoprim (25 µg); TEC, teicoplanin (30 µg); VA, vancomycin (30 µg); E, erythromycin (15 µg); C, chloramphenicol (30 µg); NA, nalidixic acid (30 µg); CIP, ciprofloxacin (5 µg); TE, tetracycline (30 µg); RD, rifampicin (5 µg). Columns sharing any letter do not show significant differences from others with that letter ($P < 0.05$).

Figure 2. Percentage of *Staphylococcus aureus* strains resistant to each antibiotic tested.

By class of antibiotic, the greatest levels of resistance were observed for beta-lactams, macrolides, quinolones and fluoroquinolones. More than 50% of strains were resistant to ampicillin (AMP), oxacillin (OX), penicillin G (P), ceftazidime (CAZ), and nalidixic acid (NA). These compounds are classified as “critically important” (AMP, OX, and P) or “highly important” (NA) antimicrobial agents for veterinary medicine by the World Organization for Animal Health (OIE, 2015). In the World Health Organization (WHO) list, AMP, P, CAZ and NA are “critically important”, and OX “highly important” antimicrobials for human medicine (WHO, 2012). It is also worrying that there was prevalence of resistance in excess of 30% to amikacin (AK), streptomycin (S), erythromycin (E), and ciprofloxacin (CIP), which are classified as “critically important” antimicrobials (OIE, 2015; WHO, 2012).

Other researchers have also observed high levels of resistance to beta-lactam antibiotics, macrolides, aminoglycosides, quinolones and fluoroquinolones in *S. aureus* isolates from animals reared for food and foodstuffs of animal origin (Osman et al., 2016). The wide prevalence of resistance to these types of antibiotic is a result to be expected, in view of the extensive use of these substances in veterinary medicine (De Briyne et al., 2014). Hence, selective

pressure exerted by the use of antibiotics (particularly when incorrectly employed at sub-inhibitory doses) has been identified as the main cause of the marked increase in the prevalence of resistance to antibiotics that has taken place over the last few decades (Capita and Alonso-Calleja, 2013).

Furthermore, resistance to antibiotics not used in veterinary medicine in Spain were detected in the present work. For instance, because of the toxic effects (carcinogenicity and mutagenicity) of chloramphenicol for consumers, more than two decades ago the European Union prohibited the use of this antibiotic in animal production by Council Regulation (EEC) No. 2377/90. Mechanisms of co-resistance or cross-resistance might be the cause of resistance to this drug, as has previously been pointed out (Capita and Alonso-Calleja, 2013). It was shown that the use of antibiotics modifies the genes for resistance carried by communities of bacteria (resistome), and that the effects on this set of genes persist for decades even in the absence of any contact with the antibiotics concerned (Sommer and Dantas, 2011). Smith et al. (2007) observed that successive exposures to antibiotics create resistance that is stable over time, and that resistant strains may compete with those that are not even when there is no selective pressure present. It

has been shown that such successive applications may have cumulative effects, so that multi-resistant strains become ever more prevalent after each new application of antimicrobials (Martins da Costa et al., 2011).

To sum up, preparations made from poultry meat are foods of questionable quality from the point of view of hygiene and sanitation, as well as being a major reservoir of strains of *S. aureus* with multi-resistance to antibiotics of clinical significance. These are worrying facts in the context of food safety. Both underline the need for those handling such foods to receive good training in the field of food hygiene, with the aim of avoiding bad practice (such as cross-contamination or insufficient cooking) and thus of reducing consumer risks. The greater prevalence of resistance that was observed for the groups of antibiotics most widely used on poultry farms suggests a link between the use of antimicrobials and the emergence of resistant strains. The need for prudent use of antibiotics in animal production is highlighted.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (Project AGL2011-29645).

REFERENCES

Abu-Ruwaida, A. S., W. N. Sawaya, B. H. Dashti, M. Murard, and H. A. Al-Othman.

1994. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *J. Food Prot.* 57:887-892.

Alonso-Hernando, A., M. Prieto, C. García-Fernández, C. Alonso-Calleja, and R. Capita. 2012. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* 23:37-41.

Álvarez-Astorga, M., R. Capita, C. Alonso-Calleja, B. Moreno, and M. C. García-Fernández. 2002. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Sci.* 62:45-50.

Álvarez-Fernández, E., A. Cancelo, C. Díez-Vega, R. Capita, and C. Alonso-Calleja. 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.

Álvarez-Fernández, E., C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández, and R. Capita. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *Int. J. Food Microbiol.* 153:281-287.

Baird, R. M., J. E. J. Corry, and G. D. W. Curtis. 1987. Pharmacopeia of culture media for food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 5:221-222.

Buzón-Durán, L., C. Alonso-Calleja, F. Riesco-Peláez, and R. Capita. 2017. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiol.* 65:294-301.

Capita, R., and C. Alonso-Calleja. 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for

- the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53:11-48.
- Capita, R., C. Alonso-Calleja, M. C. García-Fernández, and B. Moreno. 2001. Microbiological quality of retail poultry carcasses in Spain. *J. Food Prot.* 64:1961-1966.
- Capita, R., C. Alonso-Calleja, M. T. García-Arias, B. Moreno, and M. C. García-Fernández. 2002. Methods to detect the occurrence of various indicator bacteria on the surface of retail poultry in Spain. *J. Food Sci.* 67:756-771.
- CLSI. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals, 4rd Ed. Approved Standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- CNERNA-CNRS. 1996. Critères microbiologiques. Pages 353-361 in *La qualité microbiologique des aliments*. J. L. Jouve, ed. Polytechnica, Paris.
- Cousin, M. A., J. M. Jay, and P. C. Vasavada. 2001. Psychrotrophic microorganisms. Pages 159-166 in *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. F. P. Downes, and K. Ito, eds. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Dainty, R. H., and B. M. Mackey. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 73:103S-114S.
- De Briyne, N. de, J. Atkinson, L. Pokludová, and S. P. Borriello. 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Rec.* 175:325.
- Del Río, E., M. Panizo-Morán, M. Prieto, C. Alonso-Calleja, and R. Capita. 2007. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 115:268-280.
- EFSA-ECDC. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14:4634-4864.
- El-Leithy, M. A., and F. M. Rashad. 1989. Bacteriological studies on ground meat and its products. *Arch. Lebensm. Hyg.* 40:58-61.
- FAO. 2017. Food Balance Sheets, FAO. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>. Date last accessed: March 17, 2017.
- Gallo, L., R. E. Schmitt, and Z. W. Schmidt-Lorenz. 1988. Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. I. Bacterial flora and growth during storage. *LWT-Food Sci. Technol.* 21:216-223.
- Gashe, B. A., and S. Mpuchane. 2000. Prevalence of salmonellae on beef products at butcheries and their antibiotic resistance profiles. *J. Food Sci.* 65:880-883.
- Gennari, M., and F. Dragotto. 1992. A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *J. Appl. Bacteriol.* 72:281-288.
- Guerrero-Ramos, E., D. Molina-González, S. Blanco-Morán, G. Igrejas, P. Poeta, C. Alonso-Calleja, and R. Capita. 2016. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in meat preparations. *J. Food Prot.* 79:748-756.

Microbiological quality of poultry preparations

- ICMSF. 1986. Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, Vol. 2. University of Toronto Press, Toronto.
- ICMSF. 2011. Microorganisms in foods 8. Use of data for Assessing Process Control and Product Acceptance. Springer, New York.
- IFST. 1997. Development and use of microbiological criteria for foods. Food Sci. Technol. Today 11:137–176.
- Jay, J. M. 2002. A review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. J. Food Prot. 65:1200–1206.
- Lancette, G. A., and S. R. Tatini. 1992. *Staphylococcus aureus*. Page 533 in Compendium of methods for the microbiological examination of foods. C. Vanderzant, and D. F. Splittstoesser, eds. APHA, Washington, D.C.
- Lerasle, M., M. Federighi, H. Simonin, V. Anthoine, S. Rezé, R. Chéret, and S. Guillou. 2014. Combined use of modified atmosphere packaging and high pressure to extend the shelf-life of raw poultry sausage. Inn. Food Sci. Emerg. Technol. 23:54-60.
- MAGRAMA. 2016. Informe del consumo de alimentación en España 2015, MAGRAMA. Available at: http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf. Date last accessed: March 17, 2017.
- Martins da Costa, P., M. Oliveira, B. Ramos, and F. Bernardo. 2011. The impact of antimicrobial use in broiler chickens on growth performance and on the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. Livestock Sci. 136:262-269.
- OIE. 2015. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf. Date last accessed: March 17, 2017.
- OJEU. 2005. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off. J. Eur. Union L 338:1-26.
- Osman, K., J. Badr, K. S. Al-Maary, I. M. I. Moussa, A. M. Hessain, Z. M. S. A. Girah, U. H. Abo-Shama, A. Orabi, and A. Saad. 2016. Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase-positive and negative-*Staphylococcus* in chicken meat retailed to consumers. Front. Microbiol. 7:1846.
- Palleroni, N. J. 1984. Genus *Pseudomonas*. Pages 141-199 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. N. R. Krieg and J. G. Holt, eds. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Pascual-Anderson, M. R. 1992. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos, Madrid.
- Selvan, P., R. Nerendra Babu, S. Sureshkumar, and V. Venkataramanujam. 2007. Microbial quality of retail meat products available in Chennai city. Am. J. Food. Technol. 2:55-59.
- Seok K., and G. A. Bohach. 2007. *Staphylococcus aureus*. Page 493 in Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3rd ed. M. P. Doyle and R. L. Beuchat, eds. ASM Press, Washington D.C.
- Smith, J. L., D. J. V. Drum, Y. Dai, J. M. Kim, S. Sánchez, J. J. Maurer, C. L. Hofacre, and M. D. Lee. 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler

chickens. *App. Environ. Microbiol.* 73:1404-1414.

Sommer, M. O. A., and G. Dantas. 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:556–563.

Waldroup, A. L. 1996. Contamination of raw poultry with pathogens. *World Poultry Sci. J.* 52:7-25.

Wehr, H. M. 1982. Attitudes and policies of governmental agencies on microbial criteria for foods. *Food Technol.* 36:45-54.

WHO. 2012. WHO list of critically important antimicrobials. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Date last accessed: March 17, 2017.

SEGUNDA PUBLICACIÓN

Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2017). Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) of food origin: A comparison of agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized test. Food Microbiology, submitted.

Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) of food origin: A comparison of agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized test

Laura Buzón-Durán^{1,2}, Rosa Capita^{1,2}, Carlos Alonso-Calleja^{1,2*}

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

² Institute of Food Science and Technology, University of León, E-24071 León, Spain.

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

ABSTRACT

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) are a major concern to public and animal health. Thirty MRS (*Staphylococcus aureus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, and *S. xylosus*) isolates from meat and poultry preparations were tested for antimicrobial susceptibility to 11 antimicrobials (belonging to seven different categories) of clinical significance using both the standard agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized system (Sensi Test Gram-positive). It is worth stressing that 16 isolates (53.3%) exhibited an extensively drug-resistant phenotype (XDR). The average number of resistances per strain was 4.67. These results suggest that retail meat and poultry preparations are a likely vehicle for the transmission of multi-drug resistant MRS. Resistance to erythromycin was the commonest finding (76.7% of strains), followed by tobramycin, ceftazidime (66.7%), ciprofloxacin (56.7%) and fosfomycin (53.3%). An agreement (kappa coefficient) of 64% 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 98.44%, 69.64% and 83.33%, respectively. Most discrepancies between the two methods were due to isolates that were susceptible according to the disc diffusion method but resistant according to the miniaturized test (false positives).

KEY WORDS: methicillin-resistant staphylococci, MRS, antimicrobial resistance, miniaturized test.

INTRODUCTION

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major public health concern because its capacity to cause severe human infections in both the clinical and community settings (Marigadas et al., 2017). Other coagulase-positive and coagulase-negative methicillin-resistant staphylococci (MRS; for instance *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* and *S. haemolyticus*) have gained importance in recent years as they have been implicated as responsible for a variety of opportunistic infections in human populations, particularly in immunocompromised patients (Becker et al., 2014; Koksai et al., 2009). Food-producing animals and their products are considered a possible source and a transmission pathway for MRS in the community, and foodborne infections by these bacteria have been formally demonstrated for years (Buzón-Durán et al., 2017). On the other hand, antibiotic-resistant bacteria in foods are believed to serve as reservoirs of antibiotic resistance genes, which can be transferred and integrated into other, more virulent microorganisms throughout the food chain (Capita and Alonso-Calleja, 2013).

The agar disc diffusion method is most often used for the susceptibility testing of fastidious bacteria, including *Staphylococcus* spp. However, as this

method is laborious, fast and simple commercial tests for the *in vitro* determination of bacterial susceptibility to antimicrobials have been developed. The Sensi Test Gram-positive (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy) is a 24-well system containing dried antibiotics for the susceptibility testing of Gram-positive bacteria, and it produces results in 18-24 hours. In a previous work, the Sensi Test Gram-negative system was tested against *Escherichia coli* strains (Álvarez-Fernández et al., 2013). However, to the best to our knowledge, no research has been published on agreement between the conventional disc diffusion method and this miniaturized system for Gram-positive bacteria.

The objectives of this study were to determine the antimicrobial resistance patterns of methicillin-resistant staphylococci (MRS) isolates from meat and poultry preparations in Spain, and to evaluate the commercially available miniaturized Sensi Test Gram-positive system for assessing antimicrobial resistance of such strains. For this purpose, the results of the disc diffusion method and the miniaturized test were compared.

MATERIALS AND METHODS

Thirty coagulase-positive and coagulase-negative methicillin-resistant staphylococci (MRS) strains previously isolated from red meat- and poultry-based preparations in North-Western Spain were used for antibiotic susceptibility testing. Isolates belonged to the species *Staphylococcus aureus* (three strains), *S. cohnii* (one), *S. epidermidis* (seven), *S. haemolyticus* (one), *S. hominis* (three), *S. lentus* (two), *S. lugdunensis* (two), *S. sciuri* (eight) and *S. xylosus* (three).

Isolates were tested in two ways. Firstly, MRS strains were screened for susceptibility to a panel of 11 antimicrobials on Mueller-Hinton agar (Oxoid Ltd. Hampshire, UK) by a disc diffusion method (CLSI, 2013). The following discs (Oxoid) were used: gentamicin (CN; 10 µg), tobramycin (TOB; 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC; 30 µg), ampicillin-sulbactam (SAM; 20 µg), piperacillin (PRL; 100 µg), ceftazidime (CAZ; 30 µg), trimethoprim-sulphamethoxazole (SXT; 25 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), erythromycin (E; 15 µg), fosfomicin (FOS; 50 µg), and rifampicin (RD; 5 µg). After incubation (35 °C, 18-24 hours) the inhibition zones were measured and scored as sensitive, intermediately susceptible and resistant, in accordance with CLSI guidelines.

The 30 isolates were also screened for resistance to the abovementioned

antimicrobials using the miniaturized method Sensi Test Gram-positive (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy). The susceptibility testing was interpreted by assessing the change in colour of the wells in the system, and the strains were defined as sensitive, intermediate or resistant. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used as reference strain for control of both antibiotic discs and the miniaturized test. Evaluation of the commercial miniaturized test was conducted through calculation of sensitivity, specificity, efficiency and predictive values. Definitions and calculations of these values are shown in Figure 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 (Álvarez-Fernández et al., 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial resistance

A total of 30 MRS strains from red meat and poultry preparations were tested for their resistance to 11 antimicrobials of human and veterinary clinical significance. Table 1 shows the percentages of antimicrobial resistance (agar disc diffusion method) by bacterial species.

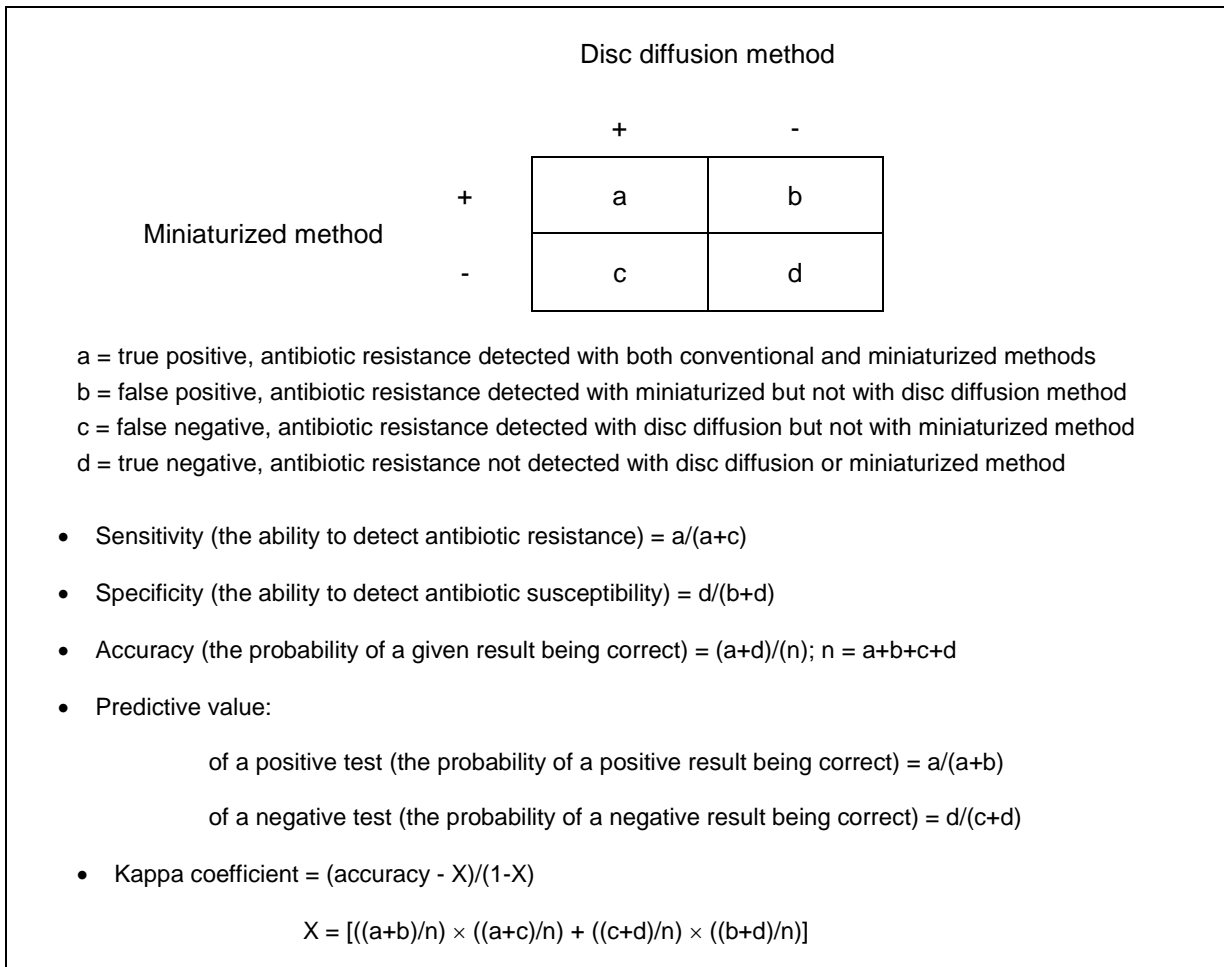


Figure 1. Definition and calculation of sensitivity, specificity, efficiency, predictive value and kappa coefficient.

Table 1. Prevalence of antimicrobial resistance (%) in 30 methicillin-resistant staphylococci (MRS) strains of food origin.

Antibiotic	<i>S. aureus</i> (n=3)	<i>S. cohnii</i> (n=1)	<i>S. epidermidis</i> (n=7)	<i>S. haemolyticus</i> (n=1)	<i>S. hominis</i> (n=3)	<i>S. lentus</i> (n=2)	<i>S. lugdunensis</i> (n=2)	<i>S. sciuri</i> (n=8)	<i>S. xylosus</i> (n=3)	All strains (n=30)
CN	33.3	0.0	0.0	100	33.3	50.0	0.0	62.5	66.7	36.7
TOB	33.3	100	28.6	100	66.7	100	0.0	100	100	66.7
AMC	33.3	0.0	0.0	100	0.0	0.0	0.0	12.5	33.3	13.3
SAM	0.0	0.0	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3
PRL	66.7	0.0	28.6	100	0.0	0.0	0.0	62.5	66.7	40.0
CAZ	66.7	100	28.6	100	0.0	100	50.0	100	100	66.7
SXT	33.3	0.0	28.6	0.0	33.3	50.0	50.0	0.0	0.0	20.0
CIP	66.7	100	0.0	0.0	33.3	100	0.0	100	100	56.7
E	66.7	100	28.6	100	100	100	50.0	100	100	76.7
FOS	33.3	100	14.3	100	33.3	50.0	0.0	87.5	100	53.3
RD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100	66.7	33.3

CN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; SAM, ampicillin/sulbactam; PRL, piperacillin; CAZ, ceftazidime; SXT, trimethoprim/sulphamethoxazole; CIP, ciprofloxacin; E, erythromycin; FOS, fosfomicin; RD, rifampicin.

High percentages of resistance were observed for erythromycin (76.7% of strains), tobramycin (66.7%), ceftazidime (66.7%), ciprofloxacin (56.7%) and fosfomycin (53.3%). These findings are of concern because the five abovementioned compounds are considered as “critically important” antimicrobial agents for human medicine according to the World Health Organization (WHO, 2011). In the World Organisation of Animal Health (OIE, 2015) list, erythromycin, tobramycin and ciprofloxacin are “critically important”, and fosfomycin “highly important”, veterinary antimicrobials. Also noteworthy is the high prevalence of resistance (more than 30% of strains) observed for piperacillin, gentamicin and rifampicin, which are classified as “critically important” antimicrobials for human medicine (WHO, 2011).

The high percentage of strains with resistance to macrolides, aminoglycosides, beta-lactams and fluoroquinolones observed in the present research is a result consistent with findings from other authors who have tested *Staphylococcus* spp. (including MRS isolates) from foods of animal origin (Hammad et al., 2012; Huber et al., 2011; Igbinsosa et al., 2016; Nunes et al., 2015; Osman et al., 2016). The high prevalence of resistance to these classes of antimicrobials is likely to be caused by the frequent use of such compounds in animal

production, as has previously been suggested (Capita and Alonso-Calleja, 2013).

Table 2 shows the different antimicrobial resistance phenotypes (agar disc diffusion method) detected among the 30 MRS isolates recovered from red meat and poultry. A total of 22 different antibiotic resistance patterns were observed. A standard definition for acquired resistance to antimicrobials as a method for proper description of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR), and pandrug-resistant (PDR) profiles of bacterial isolates of public health significance has been reported by a group of international experts, which are part of a joint initiative by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), and the Centers for Disease Prevention and Control (CDC; USA) (Magiorakos et al., 2012). In their conclusion, MDR was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories (and one or more of these have to apply); XDR was defined as non-susceptibility to at least one agent in all but two or fewer antimicrobial categories; and PDR was defined as non-susceptibility to all agents in all antimicrobial categories. This criterion was used for the characterization of the antibiotic-resistance profile of staphylococcal isolates in this study.

Table 2. Antibiotic-resistance patterns in methicillin-resistant staphylococci (MRS) isolates of food origin.

MRS species / antimicrobial resistance phenotype	Number of isolates with phenotype
<i>S. aureus</i> (n = 3)	
CN-TOB-PRL-CAZ-SXT-CIP-E-FOS	1
AMC-PRL-CAZ-CIP-E	1
Pan-sensitive	1
<i>S. cohnii</i> (n = 1)	
TOB-CAZ-CIP-E-FOS	1
<i>S. epidermidis</i> (n = 7)	
TOB-CAZ-SXT-E-FOS	1
TOB-CAZ-SXT-E	1
SAM-PRL	1
PRL	1
Pan-sensitive	3
<i>S. haemolyticus</i> (n = 1)	
CN-TOB-AMC-PRL-CAZ-E-FOS	1
<i>S. hominis</i> (n = 3)	
CN-TOB-SXT-CIP-E-FOS	1
TOB-E	1
E	1
<i>S. lentus</i> (n = 2)	
CN-TOB-CAZ-SXT-CIP-E-FOS	1
TOB-CAZ-CIP-E	1
<i>S. lugdunensis</i> (n = 2)	
CAZ-SXT-E	1
Pan-sensitive	1
<i>S. sciuri</i> (n = 8)	
CN-TOB-PRL-CAZ-CIP-E-FOS-RD	3
CN-TOB-AMC-CAZ-CIP-E- RD	1
CN-TOB-CAZ-CIP-E-FOS-RD	1
TOB-PRL-CAZ-CIP-E-FOS-RD	2
TOB-CAZ-CIP-E-FOS-RD	1
<i>S. xylosus</i> (n = 3)	
CN-TOB-AMC-PRL-CAZ- CIP-E-FOS-RD	1
CN-TOB-CAZ-CIP-E-FOS-RD	1
TOB-PRL-CAZ-CIP-E-FOS	1

For interpretation, see Table 1.

Analysis of the susceptibility status of strains revealed that five isolates (16.7%) were susceptible to all antibiotics tested (pan-susceptible), two isolates (6.7%) were resistant to one antibiotic, two isolates (6.7%) were resistant to two antibiotics, four isolates (13.3%) were multi drug-resistant (MDR) and 16 (53.3%) isolates showed a extensively drug-resistant phenotype (XDR). All *S. sciuri* and *S. xylosus* strains were classified as XDR. MDR and XDR isolates showed resistance to three (one strain; 3.3%), four (two; 6.7%), five (three; 10.0%), six (three; 10.0%), seven (seven; 23.3%), eight (four; 13.3%) or nine (one; 3.3%) antimicrobial compounds. The multiple antibiotic-resistance demonstrated for MRS isolates is consistent with studies from other authors who have found several resistant and multi-resistant staphylococcal strains in raw milk, raw meat, raw fish or fermented meat products (Hammad et al., 2012; Huber et al., 2011; Nunes et al., 2015). Considering the limited options for treating infections caused by staphylococci, it is worrisome that MRS resistant to broad-spectrum antibiotics have been introduced into the community through the food chain (Osman et al., 2016).

The average number of antimicrobial resistances per isolate was 4.67. Considering each staphylococcal species separately, data were 4.33 (*S. aureus*),

5.00 (*S. cohnii*), 1.71 (*S. epidermidis*), 7.00 (*S. haemolyticus*), 3.00 (*S. hominis*), 5.50 (*S. lentus*), 1.50 (*S. lugdunensis*), 7.25 (*S. sciuri*), and 7.33 (*S. xylosus*).

Comparison of methods for testing the antimicrobial susceptibility of MRS

Commercially available miniaturized systems for antimicrobial susceptibility testing are very suitable for routine laboratory work, and they enable the monitoring of the patterns of resistance of bacteria to a significant extent. Because of the importance of methicillin-resistant staphylococci (MRS) as a major cause of infections in humans (Buzón-Durán et al., 2017), reliable systems for determining the antibiotic resistance patterns of MRS strains are highly desirable. The present study represents the first comparative study between the conventional disc diffusion and the Sensi Test Gram-positive methods for determining the antibiotic resistance patterns of staphylococci isolates from foodstuffs.

Thirty MRS strains were tested against 11 antimicrobials using both the conventional and the miniaturized testing methods. Table 3 displays the sensitivity, specificity, and efficiency of the Sensi Test Gram-positive system, its predictive value for a positive and a negative test, respectively, and the calculation of the kappa coefficient (agreement). Because the true status of the isolates (resistant or sensitive) was not known, agar disc diffusion was used as the reference method.

Table 3. Evaluation of the miniaturized Sensi Test Gram-positive system for checking the antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) strains of food origin.

ANTIMICROBIAL	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Predictive value (%)		Kappa coefficient
				positive tests	negative tests	
CN	100	52.63	70.00	55.00	100	0.45
TOB	95.00	30.00	73.33	73.08	75.00	0.29
AMC	100	42.31	50.00	21.05	100	0.16
SAM	100	100	100	100	100	1.00
PRL	100	88.89	93.33	85.71	100	0.90
CAZ	100	10.00	70.00	68.97	100	0.13
SXT	100	70.83	76.67	46.15	100	0.49
CIP	94.12	100	96.67	100	92.86	0.93
E	100	85.71	96.67	95.83	100	0.90
FOS	93.75	85.71	90.00	88.24	92.31	0.80
RD	100	100	100	100	100	1.00
All antimicrobials	98.44	69.64	83.33	75.82	96.38	0.64

For interpretation, see Table 1 and Figure 1.

The average sensitivity (detection of resistant isolates) of the Sensi test Gram-positive method was 98.44%. A sensitivity of 100% was observed for all compounds except TOB (95.00%), CIP (94.12%) and FOS (93.75%). The average specificity (detection of sensitive isolates) was 69.64%. The ability to detect antimicrobial sensitivity of the miniaturized test was 100% for SAM, CIP and RD. Slightly lower specificity was shown for PRL (88.89%), E and FOS (85.71%). Low ($\leq 50\%$) specificity values were observed with the miniaturized test for TOB, AMC and CAZ.

The average accuracy was 83.03%, with all antibiotics showing values $\geq 50\%$. The highest accuracy values ($\geq 90\%$) were observed for SAM, PRL, CIP, E, FOS, and RD. The predictive value for a positive test ranged from 21.05% (AMC) to 100% (SAM, CIP and RD). The predictive values for a negative test were high ($\geq 90\%$) for all antimicrobials, with the exception of TOB (75.00%).

Lastly, kappa values between 0.13 (CAZ) and 1.00 (SAM, RD), with an average of 0.64, were found. 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 and Koch, 1977), the conventional agar disc diffusion method and the commercially available Sensi Test Gram-positive method showed an almost perfect agreement (kappa > 0.80) for SAM (kappa index of 1.00), PRL (0.90), CIP (0.93), E (0.90) and RD (1.00) resistance detection. Their agreement was substantial (kappa from 0.61 to 0.80) for FOS. For the rest of antimicrobials a moderate (kappa from 0.41 to 0.60; CN and SXT), fair (kappa from 0.21 to 0.40; TOB) or slight (kappa from 0.01 to 0.20; AMC and CAZ) agreement was found. According to this scale, a substantial average agreement was observed between the agar disc diffusion method and the Sensi test Gram-positive method (kappa 0.64).

Most discrepancies between the two methods were due to isolates that were susceptible according to the disc diffusion method but resistant according to the miniaturized test (false positives). This happened for CN (nine strains with resistance detected using the miniaturized method out of 19 sensitive strains according to the disc diffusion method; 47.4%), TOB (seven out of 10; 70.0%), AMC (15 out of 26; 57.7%), PRL (two out of 18; 11.1%), CAZ (nine out of 10; 90.0%), E (one out of seven; 14.3%), FOS (two out of 14; 14.3%), and SXT (seven out of 24;

29.2%). No false positives were detected for SAM, CIP or RD. On the other hand, false negative strains (resistance detected using the conventional but not the miniaturized method) were detected only for TOB (one strain without resistance detected using the miniaturized method out of 20 resistant strains according to the disc diffusion method; 5.0%), CIP (one out of 17; 5.9%), and FOS (one out of 16; 6.3%). Thus, the commercial method minimally underestimates resistance to antimicrobials because of its very high sensitivity. 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 et al., 2003), the results in the present study suggest that the Sensi Test Gram-positive method may be useful for predicting resistance to several antimicrobials in MRS isolates from meat and poultry. These results do not agree with previous findings from tests of the Sensi Test Gram-negative system (Álvarez-Fernández et al., 2013), in which a relatively low average sensitivity (71.52%) was demonstrated.

CONCLUSIONS

The data in the present research may be helpful in improving knowledge of the prevalence and antibiotic resistance of MRS in food for epidemiological studies of these microorganisms. Our results suggest the importance of retail meat and poultry

preparations as a reservoir of MRS with a resistance to broad-spectrum antibiotics, and there is potential for transfer to humans through handling, or cross-contamination or after consumption of contaminated undercooked food. Further studies are required to investigate the public health impact of the presence of MRS on meat and poultry preparations.

In comparison with the conventional agar diffusion method, the Sensi Test Gram-positive system is as technically simple and can yield results more rapidly. 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 MRS. The ability of the rapid test to detect resistant isolates (sensitivity) is especially remarkable.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the *Ministerio de Economía y Competitividad* (INIA, RTA2014-00045-C03-02) and the *Universidad de León* (ULE-2015).

REFERENCES

- Álvarez-Fernández, E., Cancedo, A., Díez-Vega, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: a comparison of agar disc diffusion and Sensi-Test Gram-negative methods. *Food Control* 30, 227-234.
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G., 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27 (4), 870-926.
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R., 2017. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiol.* 65, 294-301.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (1), 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C., 2001. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 65 (1-2), 75-82.
- CLSI -*Clinical and Laboratory Standards Institute*-, 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals, 4th Ed. Approved Standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Hammad, A. M., Watanabe, W., Fujii, T., Shimamoto, T., 2012. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and – susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 286-289.
- Huber, H., Ziegler, D., Pflüger, V., Vogel, G., Zweifel, C., Stephan, R., 2011. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet. Res.* 7, 6.
- Igbinosa, E. O., Beshiru, A., Akporehe, L. U., Oviasogie, F. E., Igbinosa, O. O., 2016. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in raw meat samples intended for human consumption in Benin city, Nigeria: Implications for Public Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 949-959.
- Koksal, E., Yasar, H., Samasti, M., 2009. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol. Res.* 164 (4), 404-410.
- Landis, J. R., Koch, G. G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33 (1), 159-174.
- 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*. *J. Clin. Microbiol.* 41 (3), 1062-1068.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.

Marigadas, V., Kuttanapilly, T. C. J., Lalitha, V., 2017. Tracing contamination of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) into seafood marketing chain by staphylococcal protein A typing. *Food Control* 78, 43-47.

Nunes, R. S. C., Del Aguila, E. M., Paschoalin, V. M. F., 2015. Safety evaluation of the coagulase-negative staphylococci microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. *BioMed Res. Int.* 2015, 483548.

OIE –Office International des Epizooties-, 2015. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf. Date last accessed: March 11, 2017.

Osman, K., Badr, J., Al-Maary, K. S., Moussa, I. M. I., Hessain, A. M., Girah, Z. M. S. A., Abo-Shama, U. H., Orabi, A., Saad, A., 2016. Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase-positive-and negative-*Staphylococcus* in chicken meat retailed to consumers. *Front. Microbiol.* 7, 1846.

WHO - World Health Organization-, 2011. WHO list of critically important antimicrobials. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Date last accessed: March 11, 2017.

TERCERA PUBLICACIÓN

Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**, 294-301.



Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms



Laura Buzón-Durán ^{a, b}, Carlos Alonso-Calleja ^{a, b}, Félix Riesco-Peláez ^c, Rosa Capita ^{a, b, *}

^a Department of Food Hygiene and Technology, University of León, E-24071 León, Spain

^b Institute of Food Science and Technology, University of León, E-24071 León, Spain

^c Department of Electrical Engineering and Systems Engineering and Automatic Control, University of León, E-24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2016

Received in revised form

8 December 2016

Accepted 7 January 2017

Available online 11 January 2017

Keywords:

MRSA

Biocides

Biofilm architecture

Biofilm viability

CLSM

ABSTRACT

The effect of sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MICs) of three biocides (benzalkonium chloride [BZK], trisodium phosphate [TSP] and sodium hypochlorite [SHY]) upon the architecture and viability of the biofilms formed by a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain of food origin (MRSA 48a) was investigated. Images were examined through confocal laser scanning microscopy (CLSM) after staining with SYTO9 and propidium iodide. Sub-MICs of BZK or TSP reduced the ability of MRSA to produce biofilm. In contrast, the presence of sub-MICs of SHY enhanced the biofilm-forming ability of MRSA when cells had undergone previous adaptation to this compound (biovolume in the observation field was $137,785.31 \pm 47,682.79 \mu\text{m}^3$ for biofilms formed in the presence of SHY, and $70,204.13 \pm 31,603.98 \mu\text{m}^3$ in the absence of biocides; $P < 0.05$). The largest amount of live (green stained) cells ($P < 0.05$) was observed in biofilms grown in the presence of SHY relative to the other conditions tested ($58,999.75 \pm 55,312.37 \mu\text{m}^3$ vs $31,976.29 \pm 38,594.98 \mu\text{m}^3$). Findings from the present work constitute the first report of biofilm production by MRSA being induced by sub-inhibitory concentrations of SHY. The data suggest that repeated use of SHY at low concentrations could represent a public health risk.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was first described in 1961 and has since become a major cause of hospital-associated infections in humans (Traversa et al., 2015), with very high mortality rates for invasive blood-stream, lung and wound infections (Normanno et al., 2015). Overall, MRSA accounts for 44% of healthcare associated infections (approximately 171,000 each year) in the European Union, leading to an estimated attributable 5400 extra deaths and extra in-hospital costs estimated to amount to some 380 million euro annually (Köck et al., 2010).

In addition to hospital-acquired MRSA infections, severe community-associated infections caused by MRSA have been reported in recent years, affecting people who did not exhibit the typical risk factors for hospital acquisition (Otter and French, 2010). According to the European Food Safety Authority (EFSA, 2009),

animals involved in the production of food and their products are considered a possible source and a transmission pathway for MRSA in the community (so-called livestock-associated MRSA), and this bacterium has been occasionally isolated from food of animal origin (Kraushaar and Fetsch, 2014; Normanno et al., 2015; Oniciuc et al., 2015). In addition, foodborne MRSA infections have been formally demonstrated for years by means of epidemiological and genetic studies (Jones et al., 2002; Kluytmans et al., 1995; Larsen et al., 2016).

Among its many virulence factors, MRSA includes the ability to produce biofilms (Raggi et al., 2013). Biofilms typically consist of complex microbial communities surrounded by a self-produced extracellular polymeric matrix that attach to living or inert surfaces, including foodstuffs, food processing equipment, and medical devices (Díez-García et al., 2012). Bacterial cells in biofilms can be protected from various environmental stresses (for instance, antimicrobials, nutrient limitation or osmotic stresses), enhancing the persistence of microorganisms at infection sites and on abiotic surfaces (Capita and Alonso-Calleja, 2013).

Biofilms on food contact surfaces are a potential source of contamination of foodstuffs which may lead to spoilage or to the

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

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

transmission of food-borne pathogens. In the nosocomial environment, biofilms have become a cause of concern because of their potential role in infections related to medical devices, especially catheters and implants (Fernández-Barat et al., 2012). Hence, a variety of biocides are widely used in food environments and clinical settings. Quaternary ammonium compounds, as benzalkonium chloride (BZK), are cationic surfactants mainly used in disinfectant and antiseptic formulations utilized in human and animal healthcare facilities, agriculture and industry (Gadea et al., 2017). Trisodium phosphate (TSP) is used as food preservative, red meat and poultry decontaminant, and cleaning agent (Capita et al., 2002), and sodium hypochlorite (SHY) is among the most widely used compound for cleaning and disinfection processes in food-producing and healthcare environments (Capita et al., 2014; Dynes et al., 2009).

An inappropriate use of biocides (for example, incorrect use, unsuitable storage or the presence of excessive residues of organic matter, known to inactivate several biocides) may provide sub-lethal exposure, and this represents a real risk for the development of adaptation to biocides (Dynes et al., 2009). An increase in biocide tolerance is a major public health issue, and recent studies have demonstrated that exposure to sub-lethal concentrations of biocides enhances biofilm production by *Staphylococcus* (Houari and Di Martino, 2007; Kumar and Ting, 2013; Lee et al., 2014; Luther et al., 2015; Redelman et al., 2012) and other pathogenic bacteria (Capita et al., 2014; Lombardo Bedran et al., 2014; Ortiz et al., 2014). However, there would hitherto appear to have been no testing of BZK, TSP and SHY against MRSA in this context.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) is a reference technique for the study of biofilms both *in vivo* and *in vitro*. Reports on investigations of the three-dimensional structures of MRSA biofilms by CLSM are scarce, and have provided global quantitative measurements (Ebrahimi et al., 2015). To differentiate between live and dead bacteria, two fluorescent dyes, SYTO9 and propidium iodide (PI), can be used. The red fluorescent PI penetrates only those cells which have disrupted membranes and is generally excluded from viable cells. In contrast, the green-fluorescent nucleic acid stain SYTO9 enters both live and dead bacterial cells. The fluorescent signal of SYTO9 is strongly enhanced when it is bound to nucleic acid and it shows a low intrinsic fluorescence signal when unbound. When both dyes are present, PI exhibits a stronger affinity for nucleic acids than SYTO9, and hence, SYTO9 is displaced by PI. Thus, viable cells emit a green fluorescence and dead cells a red fluorescence (Lee et al., 2014).

Previous studies assessing biofilm through confocal microscopy have provided qualitative analysis of bacterial viability, particularly after exposure to antimicrobials (Lee et al., 2014; Rello et al., 2010; Souza et al., 2014). Nevertheless, only a small number of studies have applied quantitative analysis to bacterial viability in biofilms (Cairns et al., 2011), and it would seem that no quantitative assessment of the bacterial viability of MRSA *in vitro* biofilms has never been performed using CLSM.

The present study was undertaken to investigate, through CLSM, the effects of sub-minimum inhibitory concentrations of three biocides (benzalkonium chloride, trisodium phosphate and sodium hypochlorite) on the structural parameters (biovolume, surface coverage, roughness, and maximum thickness) of the biofilms produced by a MRSA strain of food origin. In addition, bacterial viability in biofilms was quantitatively assessed.

2. Materials and methods

2.1. MRSA strain and culture conditions

A methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain (MRSA 48a)

previously isolated from a poultry hamburger was used. The isolate showed resistance (disk diffusion method; CLSI, 2013) to amikacin (AK; 30 µg), gentamicin (CN; 10 µg), tobramycin (TOB; 10 µg), streptomycin (S; 10 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), ampicillin-sulbactam (SAM; 20 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC; 30 µg), oxacillin (OX; 1 µg), penicillin G (P; 10 units), trimethoprim-sulphamethoxazole (SXT; 25 µg), erythromycin (E; 15 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), tetracycline (TE; 30 µg), phosphomycin (FOS; 50 µg) and vancomycin (VA; 30 µg). The strain was cryopreserved at -80°C in tryptone soya broth (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, England) supplemented with 20% (v/v) glycerol. Prior to the experiments, the frozen cells were sub-cultured twice in TSB at 37°C . Working cultures were kept at $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ on plates of tryptone soya agar (TSA, Oxoid) and were sub-cultured monthly.

2.2. Biocides

Three compounds were tested: benzalkonium chloride (BZK, Fluka, Deisenhofen, Germany), trisodium phosphate (TSP, Merck, Darmstadt, Germany), and sodium hypochlorite, with approximately 10% of active chlorine (SHY, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Sterile solutions were prepared with distilled water immediately before each experiment.

2.3. Determination of minimum inhibitory concentrations

The minimum inhibitory concentration (MIC) values were established using a micro-dilution broth method in accordance with the CLSI (2013) guidelines. For the experiment, 100-well polystyrene microplates (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finland) were used. Five colonies of MRSA 48a were taken from TSA plates, inoculated into 10 ml of Mueller-Hinton (MH) broth (Oxoid) and incubated at 37°C . Previous experiments had shown that after 24 h of incubation such bacterial cultures contain approximately 5×10^8 cfu/ml. Three decimal dilutions were performed in MH. Wells were filled with 20 µl of the chemical solution (a range of concentrations was used for each biocide) and 180 µl of the third dilution of this bacterial culture in order to give a final concentration in the well of approximately 5×10^5 cfu/ml. The inoculum concentration was confirmed by plating. The microwell plates were incubated at 37°C in the automated turbidimetric-based system Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Positive controls (200 µl of inoculum at 5×10^5 cfu/ml) were included in each experiment, as were negative (180 µl of MH broth + 20 µl of chemical solution) controls. The experiments were replicated five times on separate days. The MIC was established as the lowest biocide concentration necessary to prevent growth after 48 h of incubation (Capita et al., 2014).

2.4. Adaptation to increasing concentrations of biocide

The test was performed in the same manner as described for determining MIC. The starting concentration of biocide was half the minimum inhibitory concentration (MIC/2). When growth was observed, 20 µl of the suspension were aseptically transferred to the next well, which contained 160 µl of MH broth and 20 µl of the chemical solution. After the transfer, each well contained a concentration of biocide 1.5 times higher than the previous well. This procedure was continued until no growth was observed after 72 h of incubation at 37°C . The suspension in the last well with recorded growth was streaked on TSA plates with biocide (one-half of the maximum concentration of biocide that supported microbial growth was added to TSA). Unexposed cells were grown in TSB and subsequently streaked on TSA plates without biocides. After

incubation at 37 °C for 48 h, agar plates were held at 4 °C±1 °C for no longer than one week. All groups of cells were tested simultaneously after the same number of days of storage on agar plates.

2.5. Stability of adapted cultures

The stability of adaptive tolerance was determined for each compound by repeated subculturing of MRSA cells in non-selective broth (TSB) without biocides. This procedure was repeated every 24 h for 10 days. After 10 days, the ability of strains to grow in the presence of the maximum concentration of biocide that supported microbial growth after exposure to increasing concentrations of biocides was determined.

2.6. Biofilm determination

An analysis of the formation and structure of the biofilm was undertaken using the method previously described (Capita et al., 2014), with some modifications. Briefly, cultures were grown at 37 °C for 18 h, and two decimal dilutions in TSB were made to obtain a concentration of approximately 10⁶ cfu/ml. TSB with biocide (MIC/2) was used for growing and diluting previously exposed cells, whilst TSB without any biocide was used in the case of unexposed cells. A volume of 250 µl was added to the wells of sterile Matrix[®] 96-Well Glass Bottom Microplates (Thermo Scientific, New Hampshire, USA) having high optical quality, low fluorescent background and overall flatness, which allowed high resolution imaging. After one hour of adhesion at 37 °C, the wells were rinsed with 150 mM of NaCl in order to eliminate any non-adherent bacteria before being refilled with 250 µl of culture broth. TSB with biocide (MIC/2) and without any biocide was added to all groups of wells (containing unexposed cells and cells previously exposed to BZK, to TSP or to SHY). Thus, a total of 16 different conditions were tested. The plate was then incubated for 24 h at 37 °C. After the development of biofilm, the wells were rinsed with 150 mM of NaCl. A volume of 2.5 µl of a 1:1 mixture of SYTO9 (stock 3.34 mM in DMSO) and propidium iodide (PI; stock 20 mM in DMSO) fluorescent dyes from the BacLight Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added to 1000 µl of TSB, and 250 µl of this solution was added to each well. The plate was then incubated in the dark at 30 °C for 20 min to enable fluorescent labelling of the bacteria. During CLSM imaging, SYTO9 emits green fluorescence and is used to identify living microorganisms with an intact membrane whereas PI emits red fluorescence and stains dead bacteria with a damaged membrane.

Confocal laser Scanning Microscopy (CLSM) image acquisition was performed using a Nikon Eclipse TE 2000-U confocal laser scanning microscope with EZ-C13.60 software (Nikon Instruments Inc., New York, USA). The biofilms were observed with a forty magnification (40 ×) lens. Fluorescence was detected by excitation at 488 nm (argon laser), and emissions were collected with a 590/50 (SYTO9) or a 650LP (PI) bandpass filter.

Three stacks of horizontal plane images (512 × 512 pixels corresponding to 119 × 119 µm) with a z-step of 1 µm were acquired for each biofilm from three different areas in the well. Three independent experiments were performed for each condition on different days. Thus, a total of 144 CLSI images were obtained. For image analysis, three-dimensional projections of the structure of the biofilms were reconstructed using the Easy3D function of the IMARIS 7.5 software package (Bitplane, Zurich, Switzerland).

The quantitative structural parameters of the biofilms, such as their biovolume, substratum coverage and roughness, were calculated using the computer program BioRCA 1.4, designed by the authors of this paper using the Lazarus Integrated Development Environment (IDE). This allowed quantification of the total biofilm

population (comprising live and dead bacteria) and of the independent subpopulations represented by green fluorescence (from live cells) and red fluorescence (from dead cells). The biovolume represented the overall volume of cells (µm³) in the observation field (14,161 µm²) and provided an estimate of the biomass in the biofilm. Substratum coverage (%) reflected the efficiency of substratum colonization by the populations of bacteria. Roughness provided a measure of how much the thickness of the biofilm varied, and is an indicator of biofilm heterogeneity. The maximum thickness (µm) of biofilms was determined directly from the confocal stack images.

2.7. Statistical analysis

The quantitative structural parameters of biofilms were compared for statistical significance using one-way analysis of variance techniques. Mean separations were obtained using Duncan's multiple range test. Data-processing was performed using the Statistica[®] 8.0 software package (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Adaptation of MRSA to biocides

The MIC values of BZK, TSP and SHY for MRSA cells prior to exposure to biocides were 2.0 µg/ml (BZK), 28.0 mg/ml (TSP), and 5.0 mg/ml (SHY). After several passages through gradually increasing concentrations of the compounds, the maximum concentration of biocides that allowed bacterial growth were 5.1 µg/ml (BZK), 21.0 mg/ml (TSP), and 8.4 mg/ml (SHY). Adaptive tolerance to SHY was stable after repeated sub-culturing in non-selective broth without biocides (the strain was passed through biocide-free TSB every 24 h for 10 days). On the other hand, in the absence of selective pressure, cells that had adapted to BZK returned to their pre-adaptation sensitivity. No adaptation was observed to TSP.

3.2. Biofilm formation

Strain MRSA 48a was an isolate efficiently forming biofilms in the experimental conditions tested. To determine the effect of sub-inhibitory concentrations of BZK, TSP and SHY on biofilm production, the architecture and bacterial viability of biofilms formed in the absence or in the presence (MIC/2) of food-grade biocides by MRSA cultures previously exposed to sub-inhibitory concentrations of such compounds or unexposed was studied. Representative 24-h biofilm structures observed using CLSM for the cells under study are presented in Fig. 1. The images correspond to three-dimensional reconstructions obtained from confocal stack images by the IMARIS 7.5 software package, including virtual shadow projections on the right.

A marked variability in the three-dimensional biofilm architecture was noted between conditions. When biofilms were formed in the absence of biocides, unexposed cells and those previously exposed to SHY produced compact structures that covered most of the surface available. Cells previously exposed to BZK or TSP formed rough biofilms with a patchy coverage and confluent growth areas where the bacteria formed clumps. In the presence (MIC/2) of BZK or TSP several cell aggregates were observed for unexposed cultures and for cells previously exposed to such compounds, while cells previously exposed (adapted) to SHY displayed a marked ability to form biofilms in the presence of TSP. When the biofilms were formed in the presence of SHY (MIC/2), non-adapted cells produced a specific spatial arrangement, forming well-defined clump structures of variable thickness. It should be noted that cells adapted to SHY produced very robust structures in the

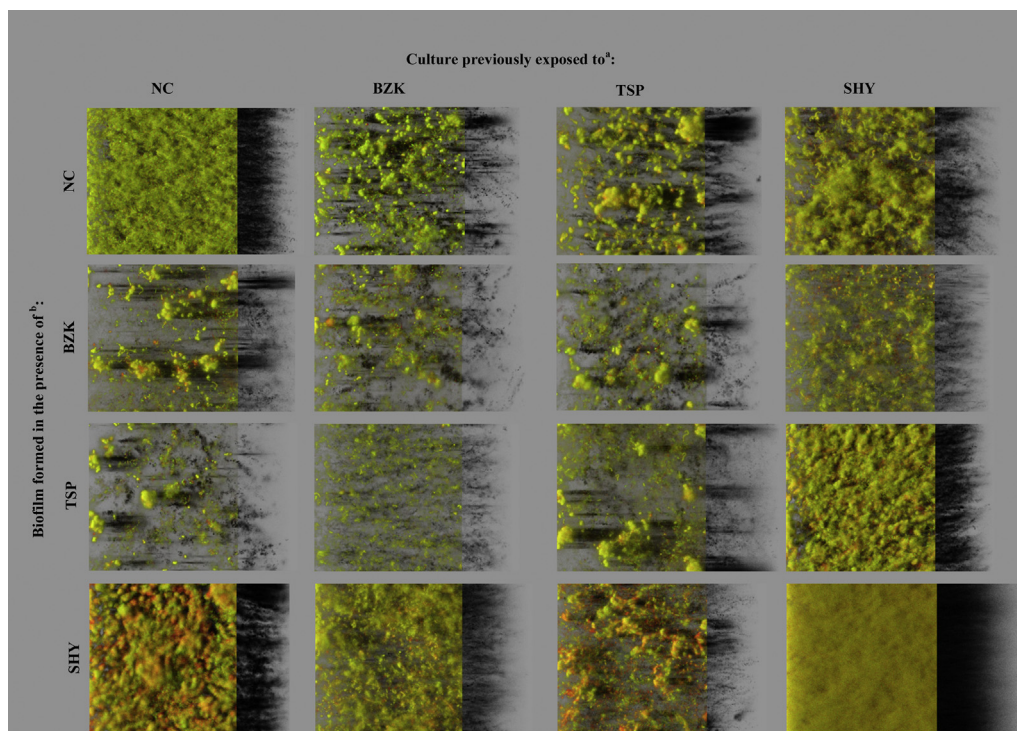


Fig. 1. Three-dimensional projections of biofilm structures of MRSA 48a under 16 different conditions, with the shadow projections on the right, obtained from confocal z-stacks using IMARIS software. ^a, cultures were previously exposed to increasing sub-inhibitory concentrations of biocides; ^b, biofilms were formed in the presence of biocides (MIC/2). NC, no compound; BZK, benzalkonium chloride; TSP, trisodium phosphate; SHY, sodium hypochlorite.

presence of this compound.

Biovolume, substratum coverage, maximum thickness and roughness parameters were extracted from confocal stack images in order to quantify biofilm structures with numerical data that would allow statistical analysis (Tables 1–4; Fig. 2). These

numerical data confirmed the visual observations. In the presence of BZK or TSP, MRSA had a reduced ($P < 0.001$) biovolume (biomass accumulation; SYTO9 + PI-stained cells; averaging $22,682.34 \pm 32,161.94 \mu\text{m}^3$) and percentage of surface area covered by cells (averaging $38.92 \pm 23.78\%$) relative to biofilms produced in

Table 1

Biovolume (μm^3) values in the observation field ($14,161 \mu\text{m}^2$) obtained for the biofilms formed by MRSA 48a in the absence or in the presence of food-grade biocides.

Biofilms formed in the presence of ² :	Culture previously exposed to ¹			
	NC ³	BZK ⁴	TSP ⁵	SHY ⁶
NC	$110,320.41 \pm 62,169.18^a$	$32,825.13 \pm 18,229.91^b_a$	$34,540.41 \pm 26,124.84^b_a$	$70,204.13 \pm 31,603.98^{ab}_a$
BZK	$26,736.87 \pm 17,372.98^a_b$	$16,584.32 \pm 19,587.65^a_{ab}$	$9730.38 \pm 11,649.73^a_b$	$20,923.19 \pm 12,495.31^a_a$
TSP	$14,343.82 \pm 4251.10^a_b$	5242.35 ± 3665.47^a_b	$12,968.44 \pm 5737.35^a_b$	$74,929.36 \pm 63,886.53^b_a$
SHY	$86,636.12 \pm 38,995.48^a_a$	$31,468.38 \pm 26,800.05^b_a$	$21,811.56 \pm 10,384.57^b_{ab}$	$137,785.31 \pm 47,682.79^b_b$

¹ Cultures were previously exposed to increasing sub-inhibitory concentrations of biocides.

² Biofilms were formed in the presence biocides (MIC/2).

³ NC, no compound.

⁴ BZK, benzalkonium chloride.

⁵ TSP, trisodium phosphate.

⁶ SHY, sodium hypochlorite.

Data (mean \pm STD) are the average of nine determinations.

Means in the same row with no superscript letters in common are significantly different ($P < 0.05$). Means in the same column with no subscript letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2

Surface coverage (%) values observed for the biofilms formed by MRSA 48a in the absence or in the presence of food-grade biocides.

Biofilms formed in the presence of	Culture previously exposed to			
	NC	BZK	TSP	SHY
NC	97.24 ± 2.47^a_a	65.98 ± 14.73^b_a	62.22 ± 25.70^b_a	89.89 ± 10.66^a_a
BZK	55.19 ± 15.22^a_b	18.36 ± 8.29^b_b	22.33 ± 13.51^b_b	62.07 ± 22.18^a_b
TSP	35.29 ± 8.46^a_c	18.66 ± 11.03^b_b	$26.25 \pm 15.50^{ab}_b$	73.21 ± 11.59^c_b
SHY	74.38 ± 16.97^a_d	$61.36 \pm 16.98^{ab}_a$	52.91 ± 20.32^b_a	99.05 ± 1.08^c_a

For interpretation see Table 1.

Table 3
Maximum thickness (μm) values observed for the biofilms formed by MRSA 48a in the absence or in the presence of food-grade biocides.

Biofilms formed in the presence of	Culture previously exposed to			
	NC	BZK	TSP	SHY
NC	31.00 ± 6.07^a_a	35.17 ± 8.04^a_a	30.67 ± 8.80^a_a	32.33 ± 8.45^a_a
BZK	$28.80 \pm 4.76^{ab}_a$	37.33 ± 3.61^a_a	18.83 ± 11.21^b_b	18.50 ± 7.85^b_a
TSP	40.33 ± 7.55^a_b	19.83 ± 11.25^b_b	40.50 ± 6.89^a_a	57.17 ± 27.68^a_b
SHY	42.75 ± 4.27^a_b	$27.00 \pm 9.63^{b}_{ab}$	$33.33 \pm 4.41^{bc}_a$	$36.50 \pm 3.08^{ac}_a$

For interpretation see Table 1.

Table 4
Roughness values observed for the biofilms formed by MRSA 48a in the absence or in the presence of food-grade biocides.

Biofilms formed in the presence of	Culture previously exposed to			
	NC	BZK	TSP	SHY
NC	0.387 ± 0.128^a_a	$0.687 \pm 0.213^{b}_{ab}$	$0.577 \pm 0.045^{bc}_{ab}$	$0.515 \pm 0.085^{c}_a$
BZK	$0.645 \pm 0.028^{b}_b$	0.780 ± 0.138^a_a	0.426 ± 0.205^c_a	$0.476 \pm 0.077^{bc}_a$
TSP	0.801 ± 0.168^a_b	$0.450 \pm 0.144^{b}_c$	0.879 ± 0.119^a_c	0.767 ± 0.271^a_b
SHY	0.648 ± 0.095^a_b	$0.565 \pm 0.089^{b}_{bc}$	0.680 ± 0.129^a_b	0.345 ± 0.068^b_a

For interpretation see Table 1.

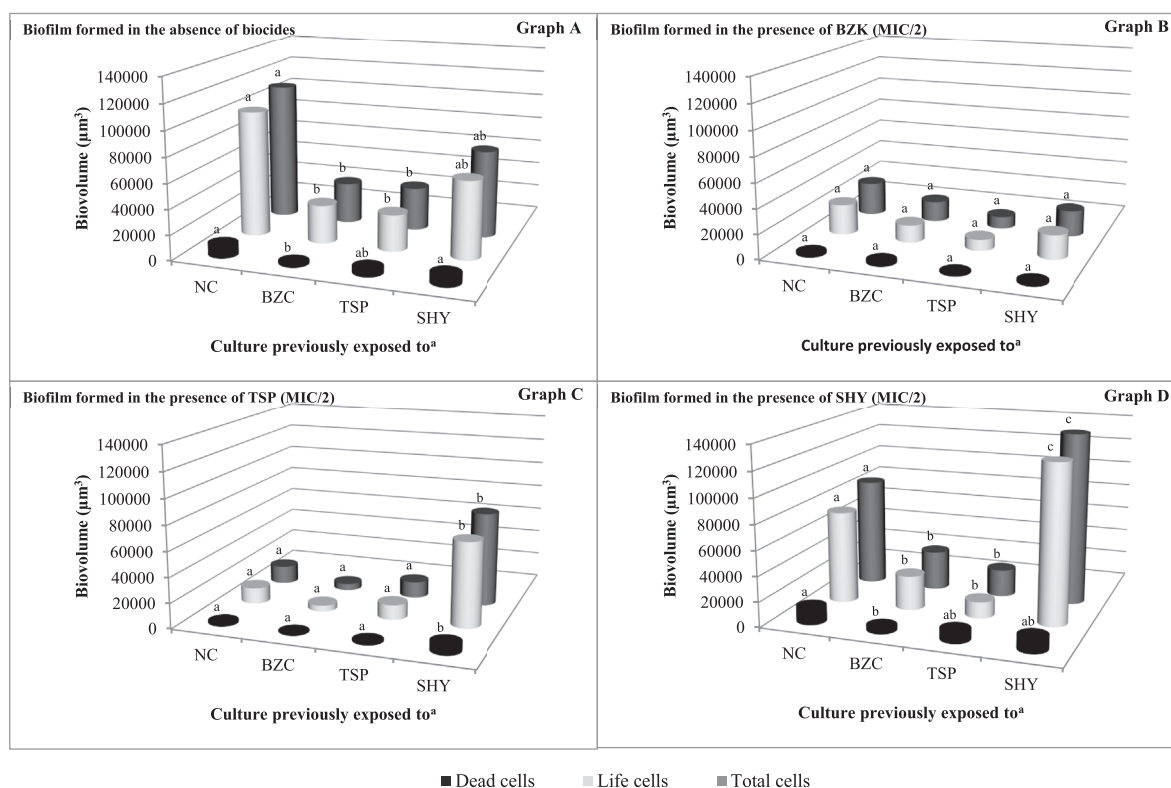


Fig. 2. Biovolume in the observation field ($14,161 \mu\text{m}^2$) of the biofilms formed by MRSA 48a in the absence of biocides (Graph A) or in the presence of sub-inhibitory concentrations (MIC/2) of benzalkonium chloride (Graph B), trisodium phosphate (Graph C) or sodium hypochlorite (Graph D). ^a, cultures were previously exposed to increasing sub-inhibitory concentrations of biocides. NC, no compound; BZK, benzalkonium chloride; TSP, trisodium phosphate; SHY, sodium hypochlorite. Data (mean \pm STD) are the average of nine determinations. Columns in a graph for the same physiologic status with no letter in common are significantly different ($P < 0.05$).

the absence of biocides ($61,972.52 \pm 48,201.34 \mu\text{m}^3$ and $78.83 \pm 21.26\%$ for biovolume and surface coverage, respectively) or in the presence of SHY ($69,425.34 \pm 58,340.92 \mu\text{m}^3$ and $71.93 \pm 23.56\%$). Cultures previously exposed to BZK or TSP showed a lower biofilm-forming ability than unexposed cells. In contrast, previous adaptation to SHY enhanced biofilm formation, markedly so in the case of biofilms formed in the presence of sub-MICs of TSP or SHY (Tables 1 and 2; Fig. 2). An inverse correlation was observed between roughness and biovolume ($P < 0.001$; -0.341), as well as

between roughness and surface coverage ($P < 0.001$; -0.322). Conversely, a direct correlation ($P < 0.001$; 0.634) was noted between roughness and maximum thickness. A positive change in the roughness coefficient indicates an increase in biofilm heterogeneity.

3.3. Bacterial viability

The percentage of dead bacteria (calculated as the biovolume of

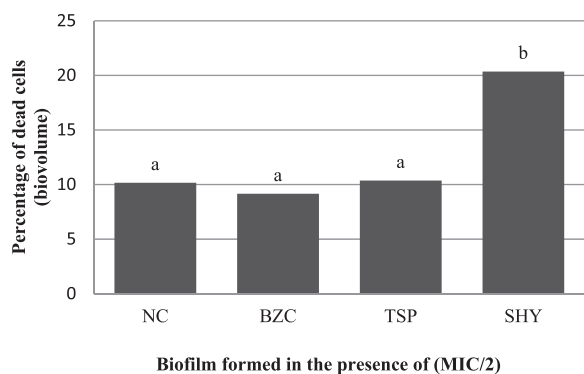


Fig. 3. Percentage of dead bacteria in the biofilms of MRSA strain 48a observed with CLSM ($n = 36$). NC, no compound; BZK, benzalkonium chloride; TSP, trisodium phosphate; SHY, sodium hypochlorite. Columns with no letter in common are significantly different ($P < 0.001$).

dead bacteria relative to total biovolume) differed from one group of cells to another (Fig. 3). The *post hoc* analysis showed higher ($P < 0.001$) percentages of dead bacteria in the presence of SHY (average $20.36\% \pm 15.54\%$) than in the absence of biocides or in the presence of BZK or TSP (average $9.92\% \pm 3.83\%$). Nonetheless, a larger ($P < 0.05$) number of live (dangerous) cells were observed in biofilms grown in the presence of SHY (biovolume $58,999.75 \pm 55,312.37 \mu\text{m}^3$) relative to the other conditions tested (average $31,976.29 \pm 38,594.98 \mu\text{m}^3$). The figures for live cells (stained with SYTO9) in the absence of biocides and in the presence of BZK and TSP were $55,714.67 \pm 43,946.72 \mu\text{m}^3$, $16,069.36 \pm 13,977.27 \mu\text{m}^3$ and $24,144.85 \pm 37,698.17 \mu\text{m}^3$, respectively.

4. Discussion

4.1. Adaptation of MRSA to biocides

The MICs obtained for the biocides tested fell in the same range of figures observed by other authors when testing *S. aureus* and other Gram-positive bacteria (Capita et al., 2001; Da Silva Garrote et al., 2013; Raggi et al., 2013). The increased and stable tolerance observed for SHY suggests that any use of this biocide which may provide a sub-lethal exposure represents a risk of the development of adaptation to this compound, as previously suggested (Capita et al., 2014).

4.2. Biofilm formation

It would appear that this is the first report demonstrating the effect of sub-inhibitory concentrations of BZK, TSP or SHY on the architecture of MRSA biofilms. Moreover, quantitative CLSM assessment of the viability of MRSA biofilms under such conditions would seem never to have been assessed hitherto.

It was found that previous exposure to sub-lethal concentrations of BZK or TSP, as well as growth in the presence of sub-inhibitory concentrations (MIC/2) of such compounds, decreased the biofilm-forming ability of MRSA, even though biofilm production was not completely prevented. These observations are in agreement with previous findings, in which it was observed that sub-MICs of BZK and TSP slightly inhibited biofilm formation (Capita et al., 2014; Raggi et al., 2013).

In contrast, exposure to sub-MICs of SHY markedly enhanced biofilm formation in cells previously adapted to this compound. These findings are in accord with previous research demonstrating that sub-inhibitory concentrations of SHY may contribute not only to the development of resistance and the promotion of cross-

resistance of bacteria to a range of antimicrobial agents (Capita et al., 2014; Molina-González et al., 2014) but also to the persistence of MRSA through biofilm induction. Because bacteria within a biofilm are typically more resistant to antimicrobials than planktonic (free-living) microbes (Hess et al., 2011), enhanced biofilm formation is thought to play an important role in the survival of bacteria (Ebrahimi et al., 2015). This has negative effects in the context of public health.

The SHY-enhanced biofilm-forming capacity is of particular concern because SHY is a disinfectant commonly used in food environments and clinical settings to reduce loads of pathogenic and spoilage microbes. Even though SHY is generally used at concentrations higher than those employed in this research, suboptimal concentrations of biocide could occur as a consequence of improper application (using an inappropriate concentration or failing to spread adequately), unsuitable storage of the formulations (resulting in a decrease in the effective concentration of biocide), or the presence of excessive amount of organic matter, which is known to inactivate several chlorine-based compounds (SCENIHR, 2009). The results of the study being reported here underline how crucial it is to maintain concentrations of SHY that are well above the MIC during disinfection processes to achieve efficient prevention of biofilm formation by MRSA.

In addition to their being ineffective in removing biofilms, there is evidence that certain antimicrobial agents at low concentrations can actually stimulate the formation of biofilm. On these lines, it has been suggested that sub-inhibitory concentrations of antibacterial compounds do not interfere effectively with the growth of bacteria, merely subjecting them to stress (Kumar and Ting, 2013). One way in which bacteria may counter external stress is to abandon planktonic life and form biofilms, which offer a greater level of resistance to external stresses. Several studies have examined the effect of low levels of external stress on the formation of biofilms, and numerous biocides and antibiotics have been reported to induce biofilm formation in different bacterial groups, including *S. aureus* (Kaplan, 2011; Kumar and Ting, 2013; Nuryastuti et al., 2009).

Bacteria respond to environmental stress by altering their cellular morphology or composition (for instance, modifying the extent to which cell surfaces are hydrophobic), a phenomenon believed to permit continued cell growth and division (Alonso-Calleja et al., 2015; Dynes et al., 2009; Lombardo Bedran et al., 2014). In a previous work, we have observed an increase in values for cell surface hydrophobicity, as well as morphological and ultrastructural changes and an enhancement of biofilm formation, in *E. coli* cells after exposure to sub-lethal concentrations, and subsequent adaptation, to SHY (Capita et al., 2014). Several studies have also reported a role for specialized cell structures, including fimbriae and pili, in the enhanced formation of biofilm by bacteria (Kumar and Ting, 2013). Furthermore, environmental conditions are known to promote biofilm formation by facilitating the production of extracellular polymeric substances (EPS), i.e. the biofilm matrix, present in bacterial biofilms, which involves a barrier to antimicrobials, whether physical, chemical, or both (Hess et al., 2011). These alterations in EPS may represent an adaptive response to such agents. However, the exact mechanism or mechanisms responsible for SHY-enhanced biofilm-forming capacity are as yet not characterized. Further studies to elucidate morphological, biochemical, and molecular changes in MRSA biofilms induced by biocide stress are warranted.

4.3. Bacterial viability

In the study being reported here, an additional advantage of the use of CLSM was the possibility of measuring not only the total

biomass within the biofilm, but also the amount of live (green) and dead (red) bacteria.

It was found that many bacteria within biofilms were able to survive treatment with low doses of biocides. The direct quantitative assessment through CLSM of bacterial viability in biofilms produced by MRSA showed similar percentages of bacterial death in the absence of biocides and in the presence of sub-MICs of BZK or TSP. In contrast, cultures grown in the presence of SHY showed a higher percentage of dead cells within the biofilm (Fig. 3). Nonetheless, the total amount of live cells in the biofilms formed in the presence of SHY were higher than in those formed in the presence of BZK or TSP or in the absence of biocides.

The low percentage (approximately 10%) of PI-stained cells in the biofilms grown in the presence of BZK or TSP indicated that the cell membranes of most cells were not compromised. However, the low biovolume and surface coverage observed in comparison with those found for control (non-exposed) cells indicated reduced viability and reproduction in the case of cells in biofilms grown in presence of BZK or TSP. It is apparent that most cells in BZK- and TSP-treated biofilms were resistant to sub-MICs of such compounds, although the cells were stressed, as suggested by other authors (Dynes et al., 2009).

5. Conclusions

In conclusion, contact with sub-inhibitory concentrations of BZK or TSP reduces the biofilm-forming ability of MRSA, suggesting that these compounds have anti-biofilm properties even at low concentrations. In contrast, the presence of sub-MICs of SHY may enhance the biofilm-forming ability of MRSA in the case of cells that had undergone previous adaptation to this biocide. The SHY-induced biofilm formation demonstrated in this study may have potential implications for food safety and public health, since the levels of SHY at which MRSA biofilm formation is enhanced may be found in food environments and the health care system. Further studies will elucidate the mechanisms through which SHY-adapted MRSA cells can enhance their biofilm-forming ability in the presence of sub-MICs of this disinfectant. Identification of the cause or causes that contribute to the enhanced formation of biofilm by MRSA cells after adaptation to SHY would be of use in gaining a better understanding of biofilm formation.

Acknowledgments

This work was supported by the *Ministerio de Economía y Competitividad* (INIA, RTA2014-00045-C03-02) and the *Universidad de León* (ULE-2015).

References

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

Cairns, S., Thomas, J.G., Hooper, S.J., Wise, M.P., Frost, P.J., Wilson, M.J., Lewis, M.A., Williams, D.W., 2011. Molecular analysis of microbial communities in endotracheal tube biofilms. *PLoS ONE* 6 (3), e14759.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 11–48.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M.C., Moreno, B., 2001. Influence of strain and trisodium phosphate concentration on growth parameters of *Listeria monocytogenes* in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 428–432.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M.C., Moreno, B., 2002. Review: trisodium phosphate (TSP) treatment for decontamination of poultry. *Food Sci. Technol. Int.* 8, 11–24.

Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1268–1280.

CLSI, 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution

Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals, 4rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. Approved Standard VET01–A4.

Da Silva Garrote, M., Gonçalves de Alencar, A.H., Rodrigues de Araújo Estrela, C., de Souza, H.A., Silveira Alves, D.R., Estrela, C., 2013. Antibacterial effect of oral antiseptics on facultative bacteria. *Stomatol* 19, 28–39.

Diez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 31, 173–180.

Dynes, J.J., Lawrence, J.R., Korber, D.R., Swerhone, G.D.W., Leppard, G.G., Hitchcock, A.P., 2009. Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can. J. Microbiol.* 55, 163–178.

Ebrahimi, A., Hemati, M., Shabanpour, Z., Dehkordi, S.H., Bahadoran, S., Lotfalian, S., Khubani, S., 2015. Effects of benzalkonium chloride on planktonic growth and biofilm formation by animal bacterial pathogens. *Jundishapur J. Microbiol.* 8 (2), e16058.

EFSA, 2009. Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA J.* 993, 1–73.

Fernández-Barat, L., Bassi, G.L., Ferrer, M., Bosch, A.M., Calvo, M., Vila, J., Gabarrús, A., Martínez-Olondris, P., Rigol, M., Esperatti, M., Luque, N., Torres, A., 2012. Direct analysis of bacterial viability in endotracheal tube biofilm from a pig model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia following antimicrobial therapy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 309–317.

Gadea, R., Fernández Fuentes, M.A., Pérez Pullido, R., Gálvez, A., Ortega, E., 2017. Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiol.* 63, 58–71.

Hess, D.J., Henry-Stanley, M., Wells, C.L., 2011. Gentamicin promotes *Staphylococcus aureus* biofilms on silk suture. *J. Surg. Res.* 170, 302–308.

Houari, A., Di Martino, P., 2007. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 652–656.

Jones, T.F., Kellum, M.E., Porter, S.S., Bell, M., Schaffner, W., 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 82–84.

Kaplan, J.B., 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* 34, 737–751.

Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Goessens, W., Hollis, R., Messer, S., Herwaldt, L., Bruining, H., Heck, M., Rost, J., van Leeuwen, N., van Belkum, A., Verbrugh, H., 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1121–1128.

Köck, R., Becker, K., Cookson, B., Van Gemert-Pijnen, J.E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R.L., Struelens, M.J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W., Friederich, A.W., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 15 (41), pii=19688.

Kraushaar, B., Fetsch, A., 2014. First description of PVL-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wild boar meat. *Int. J. Food Microbiol.* 186, 68–73.

Kumar, A., Ting, Y.-P., 2013. Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 111, 747–754.

Larsen, J., Stegger, M., Andersen, P.S., Petersen, A., Larsen, A.R., Westh, H., Agerso, Y., Fetsch, A., Kraushaar, B., Käsbohrer, A., Feßler, A.T., Schwarz, S., Cuny, C., Witte, W., Butaye, P., Denis, O., Haenni, M., Madec, J.-Y., Jouy, E., Laurent, F., Battisti, B., Franco, A., Alba, P., Mammìna, C., Pantosti, A., Monaco, M., Wagenaar, J.A., de Boer, E., van Duikeren, E., Heck, M., Dominguez, L., Torres, C., Zarazaga, M., Price, L.B., Skov, R.L., 2016. Evidence for human adaptation and foodborne transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 63, 1349–1352.

Lee, S., Choi, K.-H., Yoon, Y., 2014. Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* outbreak linked to ham. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 34, 257–261.

Lombardo Bedran, T.B., Grignon, L., Palomari Spolidorio, D., Grenier, D., 2014. Sub-inhibitory concentrations of triclosan promote *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to oral epithelial cells. *PLoS ONE* 9 (2), e89059.

Luther, M.K., Bilida, S., Mermel, L.A., LaPlante, K.L., 2015. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Dis. Ther.* 4, 219–226.

Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R., 2014. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* 40, 329–334.

Normanno, G., Dambrosio, A., Lorusso, V., Samoilis, G., Di Taranto, P., Parisi, A., 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. *Food Microbiol.* 51, 51–56.

Nuryastuti, T., Van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Irvati, S., Aman, A.T., Krom, B.P., 2009. Effect of cinnamom oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6850–6855.

Oniciuc, E.-A., Ariza-Miguel, J., Bolocan, A.-S., Díez-Valcarce, M., Rovira, J., Hernández, M., Fernández-Natal, I., Nicolau, A.I., Rodríguez-Lázaro, D., 2015. Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 34–38.

Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J., 2014. The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria*

- monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 189, 106–112.
- Otter, J.A., French, G.L., 2010. Molecular epidemiology of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect. Dis. 10, 227–239.
- Raggi, C., Filippini, P., Monaco, M., Pantosti, A., Creti, R., Baldassarri, L., 2013. Methicillin resistance, biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Clin. Microbiol. 2 (6), 1000121.
- Redelman, C.V., Maduakolam, Ch, Anderson, G.G., 2012. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. FEMS Immunol. Med. microbiol. 66, 411–418.
- Rello, J., Afessa, B., Anzueto, A., Arroliga, A.C., Olson, M.E., Restrepo, M.I., Talsma, S.S., Bracken, R.L., Kollef, M.H., 2010. Activity of a silver-coated endotracheal tube in preclinical models of ventilator-associated pneumonia and a study after extubation. Crit. Care Med. 4, 1135–1140.
- SCENIHR, 2009. Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. In: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Europ. Comm., Brussels.
- Souza, S.G., Campos, G.B., Oliveira, P.S., Sousa, D.S., Da Silva, D.C.C., Santos, V.M., Amorim, A.T., Santos, A.M.O.G., Timenetsky, J., Cruz, M.P., Yatsuda, R., Marques, L.M., 2014. Virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from ICU units in Brazil. Adv. Microbiol. 4, 207–215.
- Traversa, A., Gariano, G.R., Gallina, S., Bianchi, D.M., Orusa, R., Domenis, L., Cavalleiro, P., Fossati, L., Serra, R., Decastelli, L., 2015. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and wild animal carcasses in Italy. Food Microbiol. 52, 154–158.

CUARTA PUBLICACIÓN

Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14** (6), 350-356.

Effect of Sub-Lethal Concentrations of Biocides on the Structural Parameters and Viability of the Biofilms Formed by *Salmonella* Typhimurium

Rosa Capita,^{1,2} Laura Buzón-Durán,^{1,2} Félix Riesco-Peláez³ and Carlos Alonso-Calleja^{1,2}

Abstract

This study aimed to investigate the effect of sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MICs) of three food-grade biocides (benzalkonium chloride -BZK-, trisodium phosphate -TSP-, and sodium hypochlorite -SHY-) on *Salmonella* biofilms. The structural parameters and bacterial viability of the biofilms formed by a *S. Typhimurium* isolate from poultry was investigated by means of confocal laser scanning microscopy after staining with SYTO9 and propidium iodide. The MIC values for *Salmonella* cells before exposure to subinhibitory concentrations of biocides were 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BZK), 18.0 mg/mL (TSP), and 6.0 mg/mL (SHY). The cultures exhibited a stable acquired tolerance to BZK and SHY. The maximum concentrations of biocides that allowed bacterial growth after several passages through gradually higher concentrations of such compounds were 30.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BZK) and 10.1 mg/mL (SHY). The architecture and viability of *S. Typhimurium* biofilms varied in response to sub-MICs of different biocides. Previous adaptation to SHY enhanced ($p < 0.001$) biofilm formation (average biovolume in the observed field -14,161 μm^2 -: $139,856.15 \pm 155,213.27 \mu\text{m}^3$) relative to unexposed cells ($53,779.05 \pm 55,535.62 \mu\text{m}^3$) and cells previously exposed to BZK ($58,216.97 \pm 58,644.45 \mu\text{m}^3$) or TSP ($30,052.13 \pm 28,290.56 \mu\text{m}^3$). This was particularly marked when biofilm was grown in the absence of biocides or in the presence of sub-MICs of SHY. The highest percentage of dead cells was shown by biofilms formed by cultures previously exposed to TSP relative to the other conditions tested ($34.08\% \pm 13.74\%$ vs. $23.70\% \pm 16.16\%$; $p < 0.001$). The importance of maintaining higher than MICs of SHY during sanitizing procedures to fight foodborne infections by *Salmonella* biofilms is highlighted.

Keywords: *Salmonella*, biocides, biofilm architecture, biofilm viability, confocal laser scanning microscopy

Introduction

SALMONELLA SPP. IS the second most commonly reported zoonosis (after *Campylobacter* spp.) worldwide (CDC, 2014; EFSA-ECDC, 2016), and more than 95% of cases caused by these bacteria are foodborne (Nguyen *et al.*, 2014). The two most commonly encountered *Salmonella* serovars associated with human salmonellosis in the European Union are *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (EFSA-ECDC, 2016). The public health significance of *S. Typhimurium* has been noted because of its strong capacity to cause foodborne disease (Capita *et al.*, 2007).

Many foodborne outbreaks have been associated with biofilms (Díez-García *et al.*, 2012). As a result, a great deal of effort is devoted to maintaining efficient hygiene in all food

industries and to disrupting the formation of biofilms. Consequently, a variety of biocides, such as benzalkonium chloride (BZK), trisodium phosphate (TSP), and sodium hypochlorite (SHY) are commonly employed in food environments (Dynes *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2014).

Subinhibitory concentrations of biocides could occur as a consequence of improper application (using an inappropriate concentration or failing to spread adequately), unsuitable storage of the formulations (resulting in a decrease in the effective concentration of biocide), or the presence of excessive amounts of organic matter, which is known to inactivate several chlorine-based compounds (Capita *et al.*, 2014). Recent studies have shown that some biocides, when present at concentrations below the minimum inhibitory concentration (MIC), can induce significant biofilm formation in a variety of

¹Department of Food Hygiene and Technology, University of León, León, Spain.

²Institute of Food Science and Technology, University of León, León, Spain.

³Department of Electrical Engineering and Systems Engineering and Automatic Control, University of León, León, Spain.

SUJETO A COPYRIGHT REVISTA

SUJETO A COPYRIGHT REVISTA

SUJETO A COPYRIGHT REVISTA

SUJETO A COPYRIGHT REVISTA

SUJETO A COPYRIGHT REVISTA

- Report). Atlanta, Georgia: CDC, Department of Health and Human Services, 2014.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals, 4rd Ed. Approved Standard VET01-A4*. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- Díez-García M, Capita R, Alonso-Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol* 2012;31:173–180.
- Dynes JJ, Lawrence JR, Korber DR, Swerhone GDW, Leppard GG, Hitchcock AP. Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can J Microbiol* 2009;55:163–178.
- Ebrahimi A, Hemati M, Shabanpour Z, Dehkordi SH, Bahadoran S, Lotfalian S, Khubani S. Effects of benzalkonium chloride on planktonic growth and biofilm formation by animal bacterial pathogens. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8:e16058.
- EFSA-ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J* 2016;14:4634;pp.231.
- Fernández-Barat L, Li Bassi G, Ferrer M, Bosch A, Calvo M, Vila J, Gabarrús A, Martínez-Olondris P, Rigol M, Esperatti M, Luque N, Torres A. Direct analysis of bacterial viability in endotracheal tube biofilm from a pig model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia following antimicrobial therapy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65:309–317.
- Houari A, Di Martino P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett Appl Microbiol* 2007;45:652–656.
- Luther MK, Bilida S, Mermel LA, LaPlante KL. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Dis Ther* 2015;4:219–226.
- Nguyen HDN, Yang S, Yuk HG. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT—Food Sci Technol* 2014;55:383–388.
- Ortiz S, López V, Martínez-Suárez J. The influence of sub-minimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 2014;189:106–112.
- Puga CH, San José C, Orgaz B. Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control* 2016;65:143–151.
- Redelman CV, Maduakolam C, Anderson GG. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;66:411–418.

Address correspondence to:

Carlos Alonso-Calleja, DVM, BSc, MSc, PhD
Department of Food Hygiene and Technology
Veterinary Faculty, University of León
Campus de Vegazana, s/n
E-24071 León
Spain

E-mail: carlos.alonso.calleja@unileon.es

