



**ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A LOS
ANTIMICROBIANOS DE BACTERIAS ZONÓTICAS Y
COMENSALES AISLADAS EN ALIMENTOS DE LA
PROVINCIA DE VALENCIA**

Departamento de Microbiología y Ecología
Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Doctoranda:
Begoña Bort Tormo**

**Directores:
Dra. María Iranzo Rodenas
Dr. Pedro Martí Requena**

Valencia, noviembre 2022

Dña. María Iranzo Ródenas, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universitat de València y D. Pedro Martí Requena, Jefe de Servicio del Laboratorio de Salud Pública de Valencia. Consellería de Sanidad Universal y Salud Pública

CERTIFICAN QUE,

Dña. Begoña Bort Tormo ha realizado el trabajo titulado *Estudio de las resistencias a antimicrobianos de bacterias zoonóticas y comensales aisladas en alimentos de la provincia de Valencia*, en la Unidad de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València y en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, que presenta para optar al grado de Doctora por la Universitat de València,

Y para que así conste, extienden el presente certificado.

Burjassot, a 24 de octubre de 2022

MARIA|
IRANZO|
RODENAS

Firmado digitalmente por MARIA|IRANZO| RODENAS
Fecha: 2022.10.25 00:07:25 +02'00'

Firmado por PEDRO MARTI
REQUENA - NIF:***7366** el
día 24/10/2022 con un
certificado emitido por
ACCVCA-120

Fdo. María Iranzo Rodenas

Fdo. Pedro Martí Requena

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que, de alguna manera, han contribuido en la realización de este trabajo.

A los directores, **Dra. María Iranzo** y **Dr. Pedro Martí** no sólo por su dirección y orientación en la realización de esta Tesis, sino también, por abrirme las puertas de su laboratorio y vivir esta experiencia. Gracias por el tiempo dedicado, así como, por su constante estímulo y apoyo y, en determinados momentos, paciencia, sin los cuales este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

A todo el equipo del Laboratorio de Microbiología de Salud Pública de Valencia, que no son pocos, por haberme permitido realizar parte de mi tesis en sus instalaciones, por su apoyo, conocimientos y enseñanza de los procedimientos internos de análisis de aguas y alimentos, así como también de hacerme sentir una más de la familia. Por último y, en especial, a **Doña Marisa Camaró** y **Doña Piedad Olmos**, por sus sabios consejos, dedicación y apoyo.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, al **Dr. Salvador Mormeneo**, a la **Dra. Hortensia Rico** y al **Dr. Jesús Zueco** por sus aclaraciones y sabios consejos.

A **María**, que además de directora, me ha tratado como una hija más, mostrándome su plena confianza y humilde amistad, tanto en el ámbito laboral como en el personal. Gracias por apostar por mí desde el año 2012 cuando me presenté en tu despacho sin apenas conocernos y, queriendo saber más sobre microbiología. Una vez más, gracias por ayudarme a conseguir mi objetivo.

A **Diego** y a **mi familia**, por confiar en mí y darme todo su apoyo. Sin ellos no hubiera sido posible. A ellos va dedicado este trabajo.

A mis padres

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1 Antecedentes del tema.....	3
1.2 Antimicrobianos y resistencias.....	8
1.3 Historia de las resistencias a antibióticos.....	10
1.4 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.....	14
1.4.1 Mecanismos de resistencia intrínseca.....	14
1.4.2 Mecanismos de resistencia adquirida.....	16
1.5 Desarrollo, transmisión y diseminación de resistencias.....	17
1.6 Los alimentos como vehículos en la transmisión de resistencias antimicrobianas: La cadena alimentaria.....	21
1.6.1 Uso veterinario de antibióticos.....	21
1.6.2 Contaminación de alimentos con bacterias y/o genes de resistencia a los antimicrobianos.....	25
1.6.3 Utilización de microorganismos en la industria alimentaria.....	26
1.7 Control microbiológico de los alimentos y su tratamiento en la legislación alimentaria.....	27
2. Objetivos.....	33
3. Material y métodos.....	37
3.1 Toma de muestras, recepción en el laboratorio y conservación.....	37
3.1.1 Aguas.....	37
3.1.2 Alimentos.....	38
3.2 Procesado de las muestras.....	39
3.2.1 Aguas.....	39
3.2.2 Alimentos.....	40
3.3 Aislamiento e identificación de microorganismos.....	41
3.3.1 <i>Salmonella</i> spp.....	42
3.3.2 <i>Escherichia coli</i>	43
3.3.2.1 Aguas.....	43
3.3.2.2 Alimentos.....	44
3.3.3 <i>Campylobacter</i> spp.....	45
3.3.4 <i>Enterococcus</i> spp.....	46
3.4 Identificación de microorganismos mediante el sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre.....	46
3.5 Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos.....	47
3.6 Detección de betalactamasas de espectro extendido.....	51
3.7 Detección de betalactamasas tipo AmpC	53

3.8	Análisis de datos estadísticos.....	54
3.9	Determinación del Índice de Multirresistencia.....	54
4.	Resultados.....	57
4.1	<i>Salmonella</i> spp.....	57
4.1.1	Estudio de la presencia de <i>Salmonella</i> spp en los alimentos.....	57
4.1.2	Estudio de la resistencia de <i>Salmonella</i> spp a los antibióticos.....	59
4.1.3	Detección de <i>Salmonella</i> spp. productora de betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC o carbapenemasas.....	69
4.2	<i>Escherichia coli</i>	69
4.2.1	Estudio de la presencia de <i>E. coli</i> en aguas y alimentos.....	69
4.2.2	Estudio de la resistencia de <i>E. coli</i> a los antibióticos.....	72
4.2.3	Detección de <i>E. coli</i> productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	84
4.2.3.1	Sinergia de doble disco.....	85
4.2.3.2	Discos combinados con inhibidor.....	85
4.2.3.3	E-test.....	86
4.2.4	Detección de <i>E. coli</i> productora de betalactamasas tipo AmpC.....	88
4.3	<i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i>	89
4.3.1	Estudio de la presencia de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	89
4.3.2	Estudio de la resistencia de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> a antibióticos.....	91
4.4	<i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	100
4.4.1	Estudio de la presencia de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	100
4.4.2	Estudio de la resistencia de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> a antibióticos.....	102
5.	Discusión.....	113
5.1	<i>Salmonella</i> spp.....	114
5.2	<i>E. coli</i>	120
5.3	<i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i>	128
5.4	<i>Enterococcus faecium</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>	135
6.	Conclusiones.....	141
7.	Bibliografía.....	147
8.	Anexos.....	165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronología abreviada por año de introducción del antibiótico y organismo con resistencia específica identificada.....	12
Figura 2. Lista de la OMS de patógenos prioritarios agrupados en tres categorías según su resistencia a los antibióticos.....	13
Figura 3. Transmisión de antibióticos y resistencia a los mismos en el medio ambiente.....	20
Figura 4. Relación entre el uso de antimicrobianos, la resistencia a los antimicrobianos, la cadena alimentaria y las personas.....	23
Figura 5. Sensititre® Automated Inoculation Delivery System.....	49
Figura 6. Sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics).....	51
Figura 7. Resistencia de <i>Salmonella</i> spp. a los antibióticos ensayados.....	65
Figura 8. Distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos, de los aislados de <i>Salmonella</i> spp.	68
Figura 9. Resistencia de <i>E. coli</i> a los antibióticos ensayados.....	79
Figura 10. Distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos, de los aislados de <i>E. coli</i>	82
Figura 11. Resistencia de <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> a los antibióticos ensayados.....	96
Figura 12. Distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos, de los aislados de <i>Campylobacter</i> spp.....	99
Figura 13. Resistencia de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> a los antibióticos ensayados.....	107
Figura 14. Distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos, de los aislados de <i>Enterococcus</i> spp.....	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de microorganismos de referencia utilizadas para control interno según Norma ISO 11133:2014.....	50
Tabla 2. Número y porcentaje de muestras positivas en <i>Salmonella</i> spp. durante el periodo comprendido entre enero de 2014 y abril de 2016 para cada tipo de alimento.....	58
Tabla 3. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de carne fresca de ave.....	59
Tabla 4. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de carne fresca de ganado.....	60
Tabla 5. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de preparados de ave.....	61
Tabla 6. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de preparados de ganado.....	63
Tabla 7. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de moluscos y pescado.....	64
Tabla 8. Resistencia antimicrobiana de <i>Salmonella</i> spp. según el origen de la muestra.....	66
Tabla 9. Número de resistencias de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. a los diferentes grupos de antibióticos en relación con su origen.....	67
Tabla 10. Patrones de multirresistencia en <i>Salmonella</i> spp.....	69
Tabla 11. Presencia de <i>E. coli</i> en las muestras obtenidas de diferentes alimentos y aguas en la provincia de Valencia entre enero de 2014 y diciembre de 2015.....	70
Tabla 12. Tipos de alimentos analizados para el estudio de <i>E. coli</i> entre enero de 2014 y diciembre 2015.....	71
Tabla 13. Número y porcentaje de muestras positivas en <i>E. coli</i> durante los años estudiados por tipo de alimento.....	72
Tabla 14. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de preparados de ave.....	73

Tabla 15. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de preparados de ganado.....	74
Tabla 16. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de moluscos.....	75
Tabla 17. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de frutas y hortalizas.....	76
Tabla 18. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de aguas de consumo humano.....	77
Tabla 19. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos lácteos.....	78
Tabla 20. Resistencia a antimicrobianos de <i>E. coli</i> según el origen de la muestra.....	80
Tabla 21. Número de resistencias de las cepas de <i>E. coli</i> a los antibióticos en relación con su origen.....	81
Tabla 22. Patrones de multirresistencia antibiótica en <i>E. coli</i>	83
Tabla 23. Cepas de <i>E. coli</i> posibles productoras de betalactamasas de espectro extendido.....	84
Tabla 24. Medida en mm de los halos de inhibición utilizando discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico en <i>E. coli</i>	86
Tabla 25. Relación entre la CMI del antimicrobiano solo y la CIM del antimicrobiano combinado con el ácido clavulánico en <i>E. coli</i> obtenidos mediante la técnica de E-test.....	87
Tabla 26. Resumen de cepas de <i>E. coli</i> que presentan BLEE teniendo en cuenta los tres métodos utilizados para su detección.....	88
Tabla 27. Medida en mm de los halos de inhibición obtenidos mediante la técnica de los discos combinados con inhibidor, para detectar la presencia de cepas productoras de betalactamasas tipo AmpC.....	89
Tabla 28. Muestras positivas en <i>Campylobacter</i> spp. durante los años estudiados por tipo de alimento.....	90
Tabla 29. Número de muestras positivas en <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> por año y alimento.....	91

Tabla 30. Resistencia a antimicrobianos de cepas <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> aisladas de canal de pollo.....	92
Tabla 31. Resistencia a antimicrobianos de cepas <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> aisladas de piel de cuello.....	93
Tabla 32. Resistencia a antimicrobianos de cepas <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> aisladas de embalaje de pollo.....	94
Tabla 33. Resistencia a antimicrobianos de cepas <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> aisladas de pollo de engorde.....	95
Tabla 34. Resistencia antimicrobiana de <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> según el origen de la muestra.....	97
Tabla 35. Número de cepas resistentes a un determinado número de antibióticos.....	99
Tabla 36. Patrones de multiresistencia en <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i>	100
Tabla 37. Presencia de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> en las muestras obtenidas de aguas de consumo humano en la provincia de Valencia.....	101
Tabla 38. Número de muestras positivas en <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> por año y origen.....	102
Tabla 39. Resistencia a antimicrobianos de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> aisladas de aguas de pozo.....	103
Tabla 40. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> aisladas de fuentes y manantiales a los diferentes antibióticos.....	104
Tabla 41. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> aisladas de aguas de red pública.....	105
Tabla 42. Resistencia a antimicrobianos de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> aisladas de aguas de ríos.....	106
Tabla 43. Resistencia a antimicrobianos de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> según el origen de la muestra.....	108
Tabla 44. Número de cepas resistentes a un determinado número de antimicrobianos.....	109
Tabla 45. Patrones de multiresistencia a antimicrobianos en <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i>	110

ABREVIATURAS

AMP: Ampicilina

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido

CAC: Ceftazidima combinada con cloxaciclina

CAL: Ceftazidima combinada con ácido clavulánico

CAZ: Ceftazidima

CECT: Colección Española de Ccultivos Tipo

CHL: Cloranfenicol

CIM: Concentración mínima inhibitoria

CIP: Ciprofloxacino

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

COL: Colistina

CTC: Cefotaxima combinada con cloxaciclina

CTL: Cefotaxima con ácido clavulánico

CTX: Cefotaxima

DAP: Daptomicina

DOUE: Decisión Oficial de la Unión Europea

DST: Tecnología de Sustrato Definido

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades

EE. UU.: Estados Unidos

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

ERI: Eeritromicina

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FEL: Cefepime con ácido clavulánico

FEP: Cefepime

GEN: Gentamicina

GNID: Bacterias Gram negativas

GPID: Bacterias Gram positivas

IM: Índice de Multirresistencia

LNZ: Linezolid

MAPA: Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación

MAPAMA: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España

MCCD: Agar Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón modificado

MEM: Meropenem

MR: Multirresistentes

MSRV: Medio de Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado

NAL: Ácido nalidíxico

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

NMP: Técnica del Número Más Probable

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONPG: Sustrato cromogénico ortonitrofenol- β -D-galactopiranosido

Q/D: Quinupristin/dalfopristin

STR: Estreptomina

T: Trimetoprim

TBX: Agar Triptona-Bilis-X-Glucurónido

TCY: Tetraciclina

TEC: Teicoplanin

TIG: Tigeciclina

UE: Unión Europea

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

1. INTRODUCCIÓN

1 Introducción

1.1 Antecedentes del tema.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las enfermedades transmitidas por alimentos como *el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos o sus productos (bacterias, virus, priones, hongos, parásitos o toxinas) o no biológicos, tanto químicos (plaguicidas o metales pesados, etc.), como físicos (cuerpos extraños, contaminación radiactiva, etc.) en cantidades tales que afecten a la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas*. La contaminación puede producirse en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde la producción al consumo de alimentos.

El informe *estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria* publicado en 2015 por la OMS (OMS, 2015) es el primero en ofrecer estimaciones completas sobre la carga de morbilidad causada por treinta y un agentes contaminantes (bacterias, virus, parásitos, toxinas y sustancias químicas) a nivel mundial y regional. Esta organización estima en este informe que en el año 2010 se presentaron seiscientos millones de casos de enfermedades de transmisión alimentaria que causaron cuatrocientas veinte mil muertes, de las que ciento veinticinco mil fueron de menores de cinco años.

Dentro de este amplio espectro de enfermedades que pueden ser causadas por la ingesta de alimentos contaminados, las toxiinfecciones alimentarias son aquellas enfermedades que además de ser transmitidas por los alimentos, son

causadas por agentes biológicos o sus toxinas, y suponen uno de los peligros más importantes asociados al consumo de alimentos.

Hasta hoy, se han descrito más de doscientos cincuenta agentes biológicos causantes de diferentes de toxiinfecciones alimentarias (Carrasco *et al.*, 2017), aunque la OMS en su informe del año 2015 establece entre otros, que los microorganismos más importantes a nivel mundial involucrados en este tipo de enfermedades son diferentes bacterias (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria* spp., *Vibrio cholerae* y *Shigella*) y dos virus (norovirus y el virus de la hepatitis A).

Un informe publicado en febrero de 2019 por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), (EFSA-ECDC, 2019a) pone de manifiesto que las bacterias que con mayor frecuencia se asocian a enfermedades alimentarias en Europa son, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. y *E. coli* verotoxigénica. Además, el informe indica que, por su especial peligrosidad y altos porcentajes de mortalidad, *Listeria monocytogenes* ha adquirido una gran relevancia. Asimismo, este documento pone de manifiesto que los antimicrobianos utilizados para tratar enfermedades zoonóticas como la campilobacteriosis y la salmonelosis, son cada vez menos efectivos, apuntando al grave problema de la aparición de resistencias a antimicrobianos.

La vía zoonótica supone una de las principales vías de transmisión de enfermedades a través de los alimentos. Según el informe de la OMS publicado en 2015, en 2010, de los seiscientos millones de casos de enfermedades de transmisión alimentaria estimados, casi trescientos cincuenta millones fueron causados por bacterias de origen animal. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, o la familia de las Enterobacteriaceae, constituyen un

grave riesgo para la salud tanto en los países en desarrollo como también en países avanzados, como los países de la Unión Europea (UE) y Estados Unidos (EEUU) (Chlebicz y Śliżewska, 2018).

Estas enfermedades se han convertido en un importante problema en todo el mundo y su impacto, no solo en la salud de la población, sino también en la economía de los países, cada vez es más importante. Los costes sociales y económicos de estas enfermedades son difíciles de evaluar, ya que implican no sólo costes médicos de tratamiento y hospitalización y jornadas de trabajo perdidas, sino también, en muchos casos, daños irreversibles a las personas e incluso la muerte (Hoffmann y Scallan, 2020).

En este contexto, la promoción de un alto nivel de seguridad alimentaria jugaría un papel importante en el control de este tipo de enfermedades (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2018). Por ese motivo, las estimaciones epidemiológicas fiables sobre la carga de las enfermedades transmitidas por los alimentos son importantes para evaluar el potencial impacto de las medidas de seguridad alimentaria y asesorar a los responsables políticos sobre el uso rentable de los recursos. Sin embargo, hasta hace poco no ha existido información global precisa y consistente sobre la mayoría de los agentes o patógenos transmitidos por alimentos contaminados (Torgerson *et al.*, 2015). Es más, los resultados de las estadísticas por países han tendido a confundir en el momento de compararlos, ya que las informaciones han estado sujetas a la efectividad de los sistemas de detección correspondientes; de ahí que una incidencia más alta no necesariamente obedeciera a un mayor problema de seguridad alimentaria, sino a una mejor vigilancia (Rodríguez Torrens *et al.*, 2015; Sarno *et al.*, 2021).

En Europa, la EFSA y el ECDC, por encargo de la Comisión Europea, recopilan y analizan los datos de todos los Estados Miembros en relación con

las zoonosis y elaboran el *informe sobre fuentes y tendencias de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de enfermedades de origen alimentario*. El objetivo es mantener un seguimiento continuo de la situación epidemiológica de cada enfermedad para valorar la eficacia de las medidas preventivas puestas en marcha (MAPAMA, 2018). Asimismo, y teniendo en cuenta el gran problema actual derivado de las resistencias a antimicrobianos, la EFSA también elabora anualmente un *informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias zoonóticas e indicadoras de personas, animales y alimentos*.

En los últimos informes se recoge que, desde el año 2005 hasta el 2019, la campilobacteriosis es la zoonosis alimentaria más frecuente en la UE, incluida España, seguida por la salmonelosis. Además, se hace referencia la infección por cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga o Vero, considerada en 2019 la tercera zoonosis más frecuente. Por otra parte, y dado el alto porcentaje de mortalidad, se analiza la listeriosis observándose que la evolución de la enfermedad se ha mantenido estable en el periodo 2015-2019, pero la presencia de *Listeria* excedió el límite de seguridad alimentaria de la UE aprobado en alimentos listos para el consumo, y en este contexto, no podemos olvidarnos del incremento de casos registrados en España en 2019 y 2020 (EFSA-ECDC, 2021; MAPA, 2021).

En el año 2018, se unieron treinta y ocho institutos de Salud Pública, Salud Animal y Alimentos y la Asociación Med-Vet-Net pertenecientes a diecinueve países, para formar el *Programa Conjunto Europeo: One Health*, una red europea de excelencia para la investigación de las zoonosis en general, y en particular las transmitidas por los alimentos, la resistencia a los antimicrobianos y las enfermedades emergentes. El concepto *Una Salud* reconoce que la salud humana está estrechamente relacionada con la salud de los animales y el medio ambiente, y hace hincapié en la importancia de la gestión de la seguridad alimentaria para abordar y establecer los objetivos

sanitarios para la población. Será importante tener estimaciones fiables sobre la incidencia de las enfermedades en general, y las zoonóticas transmitidas por alimentos, en particular, y diseñar estrategias conjuntas para abordar el control de las enfermedades de transmisión alimentaria (Boqvist *et al.*, 2018).

Tampoco podemos olvidar que los microorganismos resistentes a los antimicrobianos susceptibles de ser transmitidos por los alimentos, constituyen un riesgo para la salud pública. La monitorización de las resistencias a los antimicrobianos en la cadena alimentaria viene desarrollada en una amplia legislación, tanto a nivel comunitario europeo, como en nuestro ordenamiento jurídico, estableciendo la obligación, por parte de las autoridades competentes, de recoger y analizar datos comparables sobre la resistencia a los antimicrobianos desarrollada por los agentes zoonóticos presentes en los alimentos y los animales, en la medida en que dichos datos supongan un riesgo para la salud pública, e incluir dicha información en el Informe de Fuentes y Tendencias de Zoonosis que se ha de enviar anualmente a la Comisión Europea.

De este modo, y como consecuencia del *plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de las resistencias a los antimicrobianos* establecido por la Comisión Europea, el ECDC, la EFSA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), en el año 2013 se publicó la Decisión 2013/652/UE, sobre el *seguimiento y notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos* (DOUE, 2013), que ha constituido la base esta Tesis.

1.2 Antimicrobianos y resistencias.

La sífilis, anteriormente denominada *morbus italicus, hispanicus, germanicus o gallicus*, fue bautizada en 1530 con su nombre definitivo en honor al Syphilus, protagonista de la poesía *Syphilis sive de morbo gallico* (Sífilis o de la enfermedad francesa), publicada por el médico veronés Girolamo Fracastoro (Simmons, 2002). En esta época y hasta comienzos del siglo XX, los pacientes afectados de sífilis eran tratados con sales de mercurio (Barrio, 2000). El tratamiento frente a la sífilis hizo evidenciar la expresión *Graviora quaedam sunt remedia periculus* o *Es peor el remedio que la enfermedad*, ya que las sales de mercurio son eficaces frente al microorganismo causante de la enfermedad, pero también son tóxicas para las células humanas y animales (Turnes, 2005).

A principios del siglo XX, el médico alemán Paul Ehrlich dio con el primer tratamiento eficaz contra la sífilis, el *salvarsán*. La eficacia de este tratamiento residía en el principio fundamental de la quimioterapia, *la toxicidad selectiva*. De este modo Ehrlich, basándose en el comportamiento de los colorantes, sintetizó el primer compuesto menos tóxico para las células humanas, convirtiéndose en el padre fundador de la quimioterapia (García-Sánchez *et al.*, 2010). El 4 de septiembre de 1906, Paul Ehrlich publicó un artículo donde el término *quimioterapia*, haciendo referencia a la toxicidad selectiva, era nombrado por primera vez (PEI, 2005). El investigador basó sus observaciones en la posibilidad de que el atoxil o ácido arsalínico, pudiera cambiar su estructura *in vivo*, ya que en ensayos *in vitro* no tenía eficacia. Así, en 1907 estableció junto al químico orgánico Alfred Bertheim la sustancia con estructura correcta derivada del atoxil, y tras seiscientos seis pruebas, dieron con la definitiva, a la que se le atribuyó como nombre comercial *salvarsán* (del latín *salvare*, y del alemán *arsenic*), cuyo significado es *arsénico que*

salva (Sarbu *et al.*, 2014). En esta época, también Ehrlich, comenzó a describir las resistencias a los antimicrobianos, ya que, tras la administración de las dosis iniciales, la respuesta a las siguientes dosis era menor. De este modo, presupuso que podría perderse la afinidad entre la sustancia sintetizada y el microorganismo. Apuntó, además, que el fenómeno de las resistencias se transmite y se mantiene durante generaciones (García-Sánchez *et al.*, 2010).

El siguiente gran avance en este campo se produjo en los años 30, cuando el médico alemán Gerhard Domagk, descubrió las sulfonamidas, que resultaron ser las precursoras de las sulfamidas, antimicrobianos sintéticos (Leisner, 2020). Ambos descubrimientos dieron comienzo al importante campo de la quimioterapia.

Por otro lado, se abordó el campo de los antimicrobianos naturales, con el descubrimiento de la penicilina, el primer compuesto obtenido de manera natural con actividad antimicrobiana, comúnmente denominados antibióticos (Leisner, 2020). Alexander Fleming, médico escocés, se interesó durante su carrera de investigador en la acción bacteriana natural de la sangre. Además, en uno de sus experimentos observó, cómo un hongo del género *Penicillium* inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, ya que de manera causal había contaminado su cultivo. Este antibiótico fue bautizado como *penicilina*, en honor al *Penicillium notatum*. El gran hallazgo fue publicado en el British Journal of Experimental Pathology en el año 1929 (Fleming, 1929).

El descubrimiento de la penicilina pronto fue seguido de gramicidina, estreptomycinina y una matriz de antibióticos pertenecientes a diferentes clases químicas y con diferentes actividades biológicas. Se pensaba que las enfermedades infecciosas habían sido controladas, y la magia de los antibióticos continuó durante la mitad del siglo XX, llamado la *era dorada de la quimioterapia con antibióticos* (Leisner, 2020).

Inicialmente, cuando se introdujeron en la práctica clínica, en la década de 1940, los antibióticos fueron extremadamente eficientes para eliminar las bacterias patógenas, lo que llevó a muchos a creer que las enfermedades infecciosas se convertirían en un problema del pasado y, finalmente, desaparecerían de toda la población. Sin embargo, la aparición de una rápida diseminación de microorganismos resistentes a numerosos antibióticos reflejó la falta de conocimiento sobre los procesos evolutivos y ecológicos de los ecosistemas microbianos. Las bacterias, como cualquier otro organismo vivo, evolucionan cuando se introduce una presión selectiva, por ejemplo, los antibióticos, dadas las condiciones de tiempo, herencia y variabilidad (Aminov, 2009; Merrikh y Kohli, 2020).

Se trata de un ejemplo de evolución darwiniana, donde los individuos más aptos son los que sobreviven, es decir, los microorganismos han conseguido adaptarse y en ocasiones incluso superar la barrera de los antimicrobianos. En las últimas décadas se ha generalizado el uso de esta clase de fármacos tanto en clínica humana, como en animales de granja, e incluso en agricultura, lo que ha repercutido en toda la cadena ecológica (Polo *et al.*, 2020).

1.3 Historia de las resistencias a antibióticos.

La Real Academia de la Lengua Española indica que el significado de la palabra *resistir* es *el hecho de oponerse a una acción determinada*; si esto lo trasladamos al ámbito que estamos tratando, podríamos hablar de resistencia a los antimicrobianos como *la oposición de los microorganismos a ser combatidos por estos*. Por lo tanto, concluimos que, la resistencia bacteriana a los antimicrobianos se define como *la capacidad de una bacteria para sobrevivir en presencia de concentraciones de antimicrobiano que inhiben o matan a otras de la misma especie* (Alós, 2015).

En general, los antimicrobianos actúan seleccionando las cepas resistentes, es decir, seleccionando aquellos microorganismos que mediante diferentes eventos genéticos y bioquímicos hayan adquirido resistencia a este tipo de sustancias. Esto se reconoció al poco tiempo de que estos fármacos comenzasen a emplearse clínicamente, por consiguiente, el incremento de cepas resistentes es significativo desde la aparición de los primeros antimicrobianos y sus posteriores modificaciones (Leisner, 2020).

Es llamativo el hecho de que en la década de los 80 se comercializaran antibióticos con mecanismos de acción diferentes a los iniciales, lo que podría indicar que surgieron a raíz del problema de la aparición de resistencias a los usados como primera línea de acción. De hecho, poco tiempo después del descubrimiento de la penicilina, en 1946, como se ha comentado anteriormente, Fleming alertó al mundo sobre las consecuencias de este fenómeno expresando: *No existe, probablemente, ninguna droga quimioterapéutica para la cual una bacteria en circunstancias apropiadas no pueda reaccionar por alguna vía adquiriendo resistencia* (Cafini y Alou, 2006).

Si tenemos en cuenta que los quimioterápicos son fármacos con una disponibilidad generalizada, relativamente seguros y un coste habitualmente bajo, podemos entender el hecho de que sean los medicamentos que más se han utilizado de forma incorrecta a lo largo de la historia y hayan dado lugar a uno de los problemas de salud pública más graves (Habboush y Guzman, 2020; Morel *et al.*, 2020).

Analizando cual ha sido la cronología del descubrimiento de diferentes antimicrobianos, resulta evidente que todos estuvieron incentivados por algo. Ese algo fue una mezcla de motivos entre los que podemos destacar, por una parte, la inquietud de los investigadores y de la industria y su afán por

conseguir nuevos fármacos, pero, por otra parte, innegablemente, la aparición de diversos niveles de resistencias bacterianas también jugó un papel muy importante (Figura 1). Esto generó una competencia entre los microorganismos (generando resistencias y seleccionándose en pro de éstas) y el hombre, que llevó a cabo la búsqueda de nuevos compuestos más eficaces y seguros para la lucha antimicrobiana. Si bien el hombre no ha cedido en su lucha, los microorganismos tampoco lo han hecho, y estos últimos han ido sacando ventaja, lenta e inexorablemente (Errecalde, 2004). Valga en primer lugar como ejemplo el caso de la penicilina. Si al poco de introducirse la penicilina en la práctica clínica la gran mayoría de las cepas de *S. aureus* eran sensibles, actualmente lo son menos del 5-10% (Fisher y Mobashery, 2020). El fenómeno de resistencia a la penicilina fue descrito por Kirby (1944) poco tiempo después de su descubrimiento, al relacionar la falta de respuesta de *S. aureus* con la producción de penicilinas, que inicialmente no tenía.

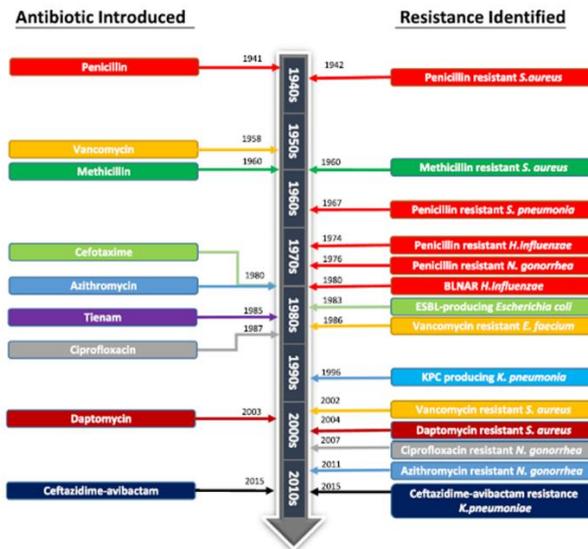


Figura 1. Cronología abreviada por año de introducción del antibiótico y organismo con resistencia específica identificada (Lai *et al.*, 2022).

Si nos centramos en otros compuestos, a principios de la década de los ochenta del siglo XX todas las cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* eran sensibles a la cefotaxima en España; hoy son resistentes el 13 y 16%, respectivamente. Algo similar ocurrió con las fluoroquinolonas, ya que a mediados de la década de los ochenta del siglo XX prácticamente todas las cepas de *E. coli* presentaban sensibilidad; mientras que hoy son resistentes el 34% (Alós, 2015).

A partir de entonces, es un hecho repetidamente comprobado que la introducción de un fármaco antimicrobiano en la práctica clínica se sigue de la aparición de cepas resistentes al mismo, distintas de las que lo eran inicialmente de manera natural (Hutchings *et al.*, 2019).

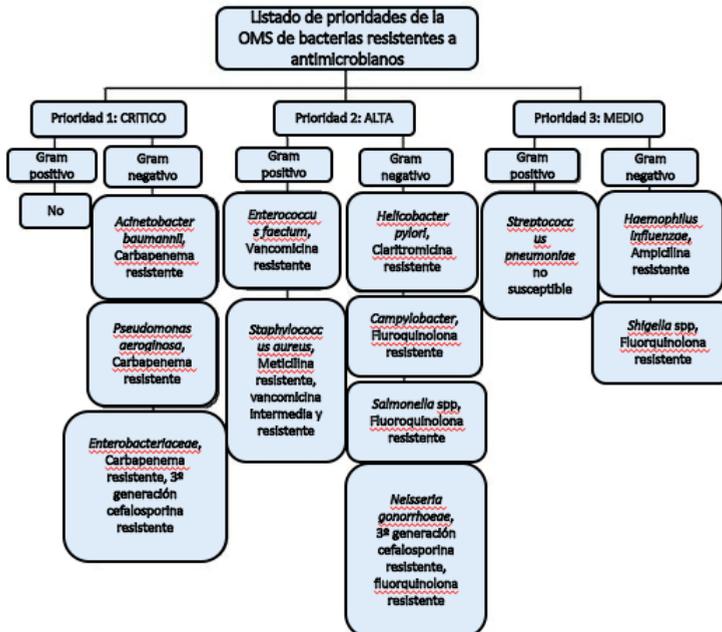


Figura 2. Lista de la OMS de patógenos prioritarios agrupados en tres categorías según su resistencia a los antibióticos (Breijyeh *et al.*, 2020).

Actualmente la resistencia a los antimicrobianos representa una enorme crisis de salud mundial y una de las amenazas más graves a las que se enfrentan los seres humanos en la actualidad. Algunas cepas bacterianas han adquirido resistencia a casi todos los antibióticos (Breijyeh *et al.*, 2020). En 2017, la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, patógenos que representan una gran amenaza para los seres humanos y para los que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos (Figura 2). La lista se clasifica según la urgencia de necesidad de nuevos antibióticos como prioridad crítica, alta y media, con el fin de orientar y promover investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos (OMS, 2017).

1.4 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Son numerosas las causas por las cuales se adquieren resistencias en poblaciones bacterianas. El desarrollo de la resistencia a los antibióticos se produce a través de mecanismos de mutación, transformación, conjugación y/o transducción, a través de dos vías: intrínseca y adquirida (Holmes *et al.*, 2016).

1.4.1 Mecanismos de resistencia intrínseca.

La resistencia intrínseca se desarrolla debido a la adaptación evolutiva de las bacterias a su entorno, a través de mutaciones de genes preexistentes encontrados en los cromosomas de las bacterias, es decir, una resistencia que de manera natural les permite un alto grado de adaptabilidad en el entorno (Ventola, 2015). Se fundamenta en la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos, o bien modificaciones que impiden la llegada de dicho fármaco a su punto de acción, interrumpiendo de esta manera la función del

antibiótico. Durante este proceso evolutivo, los errores genéticos son acumulados por las células bacterianas en sus genes (plásmidos o cromosomas), y a través de la transferencia vertical de genes, transfieren estos genes a las células de la progenie, causando resistencia intrínseca o innata (Founou *et al.*, 2016; Breijyeh *et al.*, 2020). Algunas formas de resistencia intrínseca son:

I. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa

Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas, proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa, que son capaces de regular la entrada de algunos elementos, por ejemplo, los antibióticos. Que las porinas disminuyan en número, o que alteren su estructura haciéndose más estrechas, disminuirá la cantidad de antimicrobiano susceptible de entrar en la célula (Nikaido, 2003; MacNair y Brown, 2020).

II. Bombas de expulsión

Actúan justo de manera contraria a las porinas. Son proteínas situadas en la membrana citoplasmática que se encargan de eliminar al medio extracelular sustancias que han sido introducidas en el microorganismo. Podemos encontrar incluso bombas de expulsión multidroga, capaces de expulsar diferentes sustancias (Higgins, 2007; Alcalde-Rico, 2016).

III. Modificación enzimática del antimicrobiano

Muchas bacterias son capaces de sintetizar enzimas que modifican de forma específica e irreversible los antibióticos. La actuación puede llevarse a cabo de dos formas claramente diferentes: la enzima puede inactivar el antibiótico, o bien rompiendo los enlaces covalentes de su estructura, o bien modificarlo

químicamente por la adición o sustitución de radicales de su molécula (Schwarz *et al.*, 2017). Un claro ejemplo de este mecanismo son las β -lactamasas, que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo β -lactámico ocasionando resistencia a los compuestos que lo poseen (Lima *et al.*, 2020).

IV. Modificación de la diana de acción

Una alteración en la diana del antibiótico acarreará la incapacidad de unión del antimicrobiano y, consecuentemente, la resistencia al mismo. Es el caso de las modificaciones estructurales que afecta a las proteínas de unión a penicilina presentes en la pared bacteriana de algunas cepas resistentes a este antibiótico (Miyachiro *et al.*, 2019).

1.4.2 Mecanismos de resistencia adquirida.

Una cepa bacteriana puede adquirir resistencia mediante cambios precisos en el propio cromosoma bacteriano (mutaciones) o bien mediante la transferencia de material genético procedente de bacterias ya resistentes, plásmidos, integrones o transposones (Iwu *et al.*, 2020). Los genes de resistencia (genes-R) pueden mantenerse en las bacterias originarias y su descendencia, lo que se conoce como transmisión vertical, o diseminarse de forma horizontal, entre bacterias con una cierta relación entre sí (Alekhshun y Levy, 2007; Liu *et al.*, 2020; Larsson y Flach, 2022).

Los mecanismos genéticos involucrados en una transferencia genética horizontal incluyen: 1) la conjugación por medio de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones; 2) la transformación de ADN libre en el ambiente y 3) la transducción por medio de bacteriófagos. Estos pueden ocurrir en el suelo, en el agua, en el sistema digestivo de humanos y animales, así como en los alimentos.

La resistencia mediada por plásmidos se considera la vía de difusión más importante clínicamente, debido a que los genes de resistencia se pueden transferir tanto entre la misma especie como entre especies e incluso géneros diferentes (Liu *et al.*, 2020). Estos plásmidos de resistencia (factores de resistencia, factores-R) son fragmentos de ADN extracromosómico y circulares que son incapaces de replicarse por ellos mismos. Contienen genes que degradan los antibióticos y modifican los sistemas de transporte de las membranas. Los factores-R pueden contener uno o más genes de resistencia a uno o varios antibióticos, lo que se traduce en que la bacteria que contenga dicho plásmido será resistente a más de un tipo de antibióticos, con distintos mecanismos de acción (Alekhshun y Levy, 2007; Martínez-Martínez y Calvo, 2010).

La transformación es la alteración genética de una célula resultante de la absorción directa, incorporación y expresión del material genético exógeno, mientras que la transducción es un proceso de transferencia de genes mediado por bacteriófagos.

1.5 Desarrollo, transmisión y diseminación de resistencias.

Los microorganismos tienen una de las formas de vida más extendidas de nuestro planeta, han demostrado una gran capacidad de adaptación, y se han encontrado en todos los ambientes posibles, incluso a presiones muy elevadas o temperaturas extremas (Kohli *et al.*, 2020). Este hecho nos aporta información acerca de su gran capacidad de adaptación, además de su alta capacidad de intercambio de información genética y su alta tasa de replicación (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013).

Si bien el uso terapéutico de antibióticos, seguido de la inevitable aparición de resistencias es un fenómeno moderno, estas moléculas y los determinantes genéticos de la resistencia estaban en uso por microorganismos ambientales mucho antes de que los humanos las descubrieran (Waglechner *et al.*, 2021). Existen estudios que demuestran que los genes de resistencia ya se encontraban en bacterias medioambientales previamente al uso generalizado de antimicrobianos por el ser humano. Por ejemplo, cuatro de cada treinta cepas de *E. coli* que fueron liofilizadas en 1950 fueron resistentes a todos los antibióticos testados cuando se cultivaron muchos años después. Otro caso es el de las cuatrocientas treinta y tres cepas de enterobacterias coleccionadas en todo el mundo entre 1917 y 1952 (Colección Murray), de las cuales once fueron resistentes tanto a ampicilina como a tetraciclina (Baker *et al.*, 2015; Bennett y Baker, 2019). Estos genes de resistencia pueden evolucionar una vez son adquiridos por bacterias patógenas o comensales del hombre o de animales, sin olvidarnos que la presión selectiva que acarrea el uso masivo de antibióticos en los últimos setenta años ha contribuido a la diversificación genética de los genes de resistencia (Windels *et al.*, 2020).

Por otra parte, cada vez es más frecuente la asociación de diferentes mecanismos de resistencia para la misma familia de antibióticos en una misma cepa, teniendo en cuenta el hecho que la prevalencia de la resistencia no solo ha aumentado en bacterias causantes de infecciones, sino también en aquellas inocuas para el hombre (D'Costa, 2011; Rodríguez-Rojas, 2013; Aarts y Margolles, 2015).

Cuando empleamos antibióticos, estamos sometiendo a las bacterias a un factor de estrés, las bacterias resistentes tendrán la posibilidad de multiplicarse, dando lugar a una población de bacterias resistentes, y se habrán eliminado aquellas incapaces de resistir la acción del antimicrobiano. El empleo incorrecto de los antibióticos ya sea por posología incorrecta, no

elección de la terapia adecuada, y en casos de mayor gravedad, por no tener en cuenta las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del paciente en el metabolismo y eliminación de dicho antibiótico, son procesos clave para la aparición y propagación de resistencias (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013; Dodds, 2017).

Por otra parte, estudios recientes sugieren que los nuevos estándares socioeconómicos y la creciente movilidad internacional, en definitiva, la globalización, pueden desempeñar un papel muy importante a la hora de explicar las tendencias geográficas en la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos, ayudando a su propagación (Frost *et al.*, 2019; Larsson y Flach, 2022).

Son numerosas las vías por las que los microorganismos resistentes a los antibióticos pueden diseminarse en el medio ambiente (Figura. 3). No podemos olvidarnos de que los repetidos vertidos de antibióticos al medio ambiente a través de las aguas residuales también pueden dar lugar a la aparición de cepas resistentes. En las depuradoras, por ejemplo, conviven bacterias de origen ambiental, humano y animal, por lo que la selección y posterior diseminación de microorganismos y genes resistentes está garantizada (Iranzo *et al.*, 2018; Polianciuc *et al.*, 2020; Larsson y Flach, 2022).

En las últimas dos décadas, el desarrollo de resistencias antimicrobianas como resultado del uso agrícola de antibióticos que podrían afectar al tratamiento de enfermedades que afectan a la población humana y que requieren intervención antibiótica, se ha convertido en un importante problema de salud pública mundial (Manyi-Loh *et al.*, 2018). Según el ECDC, el uso agrícola de antibióticos es responsable de al menos el 20% de las resistencias a antimicrobianos detectadas en humanos, siendo muchas las rutas

documentadas por las cuales estos organismos se pueden transferir de las granjas al hombre, aun sin entrar en la cadena alimentaria: uso de estiércol como fertilizante, transporte de animales, a través de animales no domesticados o de trabajadores agrícolas, etc. (Makary *et al.*, 2018).

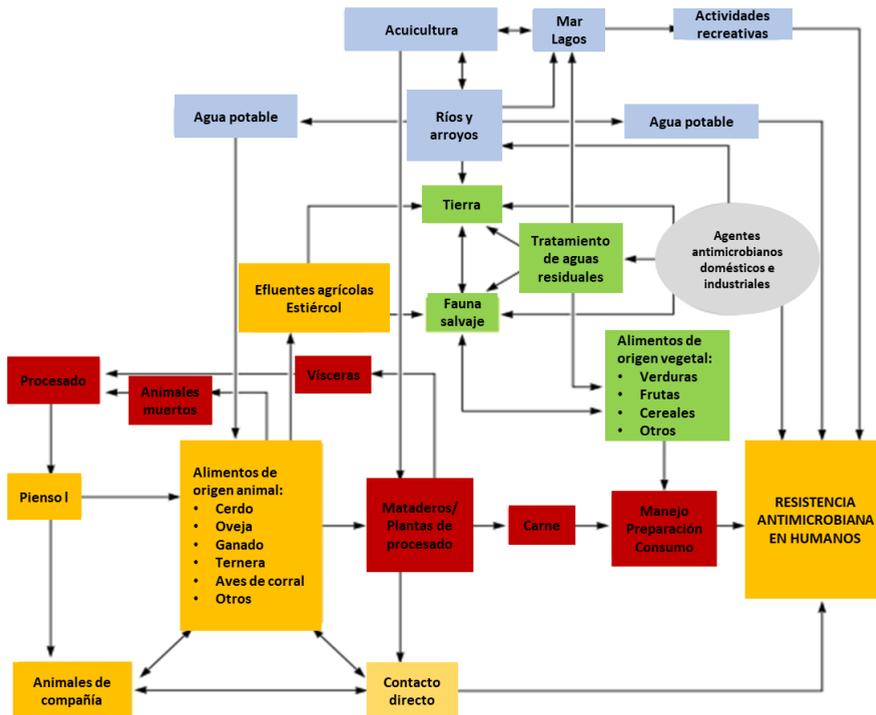


Figura 3. Transmisión de antibióticos y resistencia a los mismos en el medio ambiente (Adaptada de Davies y Davies, 2010).

Cabe también destacar la relación directa que existe entre el uso de antimicrobianos en animales y la aparición de resistencias en humanos. Durante ocho décadas, el uso indebido y el abuso de antibióticos en animales ha favorecido la propagación de cepas resistentes a antimicrobianos, abriendo otra vía al problema, al poder actuar estos animales como reservorio y, por tanto, como fuente de diseminación y que da paso a la implicación de los

alimentos en la diseminación de resistencias (Lees *et al.*, 2020; Novais y Freitas, 2020; Larsson y Flach, 2022).

1.6 Los alimentos como vehículos en la transmisión de resistencias antimicrobianas: La cadena alimentaria.

Durante las últimas décadas, ha surgido una nueva preocupación con respecto a la cadena alimentaria, ya que puede desempeñar un papel importante en la transmisión de bacterias resistentes, así como genes de resistencia del reino animal a los humanos. Varios estudios recientes destacan el papel de los entornos de procesamiento de alimentos como posibles puntos críticos de resistencias antimicrobianas, que contribuyen a este fenómeno de propagación (Bergšpica *et al.*, 2020; Larsson y Flach, 2022).

1.6.1 Uso veterinario de antibióticos.

No es incorrecto decir que los antibióticos se introdujeron en la producción animal por accidente. Después de la Segunda Guerra Mundial, la necesidad de aumentar la producción de alimentos llevó al uso de suplementos vitamínicos, el ácido fólico y las vitaminas D y B12 entre otros, ayudaron a mejorar la salud animal en general. En 1946, Moore *et al.* publicaron que el uso de quimioterápicos, como las sulfonamidas y la estreptomicina, junto con una dieta suplementada con ácido fólico daba lugar a resultados inesperados en el crecimiento de las aves de corral, en concreto pollos, observándose un mayor crecimiento que cuando la dieta se complementó únicamente con ácido fólico (Dodds *et al.*, 2017).

Actualmente, según la OMS, el uso de antibióticos en animales se puede clasificar en tres categorías principales: uso terapéutico, prevención de enfermedades y promoción del crecimiento (Patel *et al.*, 2020). A pesar de estos beneficios, existe una preocupación considerable desde la salud pública, la seguridad alimentaria y las perspectivas regulatorias sobre el uso de antimicrobianos en animales o productos destinados al consumo humano. Hemos de saber que el tracto gastrointestinal de animales y humanos representa un ecosistema extremadamente favorable para los intercambios de los genes de resistencia entre bacterias que pertenecen a géneros tanto iguales como diferentes, por lo que, si dichas bacterias llegan hasta este sistema por la vía de los alimentos, la diseminación de las resistencias se puede favorecer mucho más (Mała y Popowska, 2016).

La propagación de la resistencia a algunos antibióticos es particularmente preocupante. Muchas clases de antibióticos utilizados en humanos (medicamente importantes) se utilizan y se encuentran actualmente en la carne de vacuno, lácteos, industrias porcina y avícola, etc. En los EEUU, las industrias relacionadas con el ganado vacuno y porcino están involucradas en 42% y 39%, respectivamente, de las ventas de antibióticos destinados a su uso en animales productores de alimentos (Patel *et al.*, 2020; Kovačević *et al.*, 2022). Valga como ejemplo el hecho de que la carne de animales de granja a menudo contiene genes de resistencia activos contra betalactámicos de tercera y cuarta generación, que son cruciales en la medicina humana. El análisis genético de cepas bacterianas y genes de resistencia detectados en animales de granja, alimentos y los seres humanos ha evidenciado importantes similitudes y características genéticas comunes (Bennani *et al.*, 2020).

Las bacterias portadoras de genes de resistencia pueden transmitirse a los humanos directamente a través de cadena alimentaria por el consumo de alimentos crudos y cocidos inadecuadamente, la manipulación de alimentos

crudos, por contaminación cruzada con otros alimentos, o indirectamente a través del medio ambiente (Bennani *et al.*, 2020) (Figura 4).

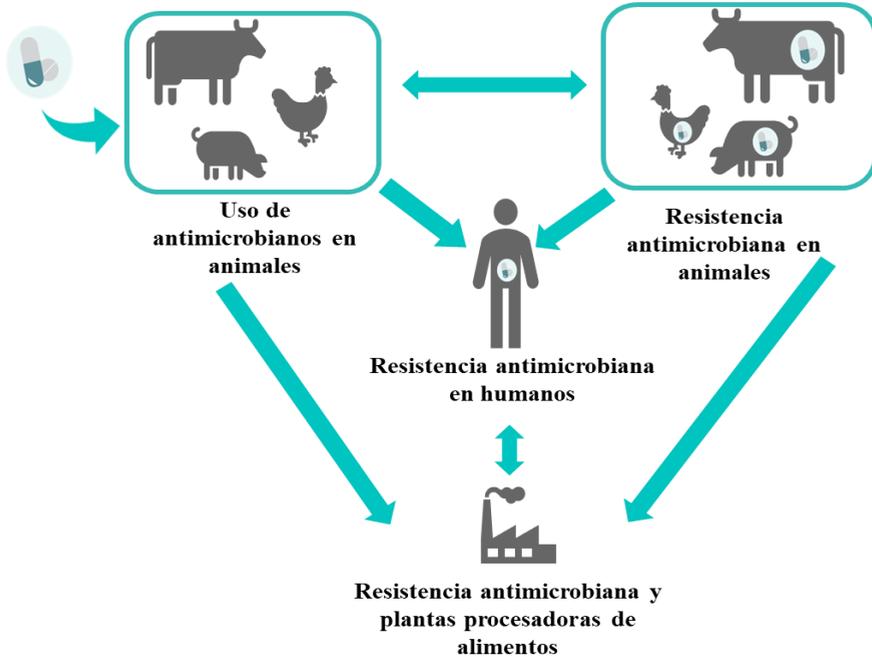


Figura 4. Relación entre el uso de antimicrobianos, la resistencia a los antimicrobianos, la cadena alimentaria y las personas (adaptadas a Bennani *et al.*, 2020).

Las evidencias sugieren que existe una correlación entre la cantidad de antimicrobianos utilizados en animales y el desarrollo de resistencias asociadas a bacterias zoonóticas (Bennani *et al.*, 2020), por lo que el contacto con concentraciones subinhibitorias de antibióticos durante un tiempo continuado, como agentes promotores del crecimiento, se ha convertido en una amenaza cada vez mayor tanto para humanos como para animales, siendo particularmente efectivo para la selección de cepas resistentes, habiendo quedado demostrado que el uso de antimicrobianos en animales está

estrechamente relacionado con la aparición de resistencias en humanos (Wenguang *et al.*, 2018; Kovačević *et al.*, 2022).

Esta relación entre la utilización de antibióticos en animales y la aparición de resistencias en humanos se ha investigado utilizando distintas aproximaciones. La mayoría de los estudios se han centrado en las vías de transmisión de bacterias resistentes de animales a humanos, es decir, en estudios de ecología. Sin embargo, no podemos olvidar que, aunque en menor medida, también existen estudios sobre la aparición de resistencia en bacterias y su impacto en los seres humanos (Larsson y Flach, 2022). Recientemente Bennani *et al.* (2020) han analizado los vínculos entre el uso de antimicrobianos en animales y la aparición de resistencias en personas y en estos mismos animales, demostrando la relación entre ambos hechos. Es más, tomando como referencia diferentes estudios en distintos países europeos concluyen que las intervenciones para reducir el uso de antimicrobianos en animales fueron efectivas para reducir la aparición de resistencia en los mismos, en la cadena alimentaria y en el hombre.

En el año 2015, la EFSA, la EMA y el ECDC publicaron el primer informe conjunto del *Análisis Interinstitucional de Consumo y Resistencia de Antimicrobianos* (ECDC-EFSA-EMA, 2015), centrado en el estudio de las asociaciones entre el consumo de antibióticos en seres humanos y animales y la aparición de resistencia. En 2017 se publicó una segunda edición de este informe, cuyas conclusiones confirmaron el vínculo entre el consumo de antibióticos y la aparición de resistencia en humanos y animales. En España, el primer Informe JIACRA-ES (2017), apunta a la relación positiva entre la cantidad de antibióticos usados en personas y animales y el desarrollo de resistencia en las bacterias de ambos y, en menor grado, a la relación positiva entre el uso de antibióticos en animales y la tasa de resistencia en bacterias de origen humano, coincidiendo con las tendencias registradas en los informes

Europeos. Este documento hace especial mención a la relación entre el porcentaje de resistencia a macrólidos de cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* de origen animal y el porcentaje de resistencia de las cepas de origen humano.

1.6.2 Contaminación de alimentos con bacterias y/o genes de resistencia a los antimicrobianos.

La existencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos en el ambiente, en el suelo, en el agua y en la materia fecal humana o animal, puede dar como resultado la contaminación de los alimentos. En los mataderos puede producirse contaminación fecal durante el proceso del sacrificio. Los productos vegetales pueden contaminarse por el uso de agua de riego contaminada con heces o con vertidos de aguas residuales, o al estar en contacto con el suelo o fertilizantes que contengan desechos animales contaminados con bacterias resistentes. En otras palabras, los alimentos y los entornos de procesamiento de alimentos podrían ser reservorios y vehículos de transmisión de las resistencias antimicrobianas a los seres humanos y causar un impacto importante en la salud pública (Verraes *et al.*, 2013; Hudson *et al.*, 2017).

Dentro de este contexto, también se deben considerar las prácticas en la manipulación de los alimentos, en donde juegan un papel muy importante, no sólo el ambiente y de los utensilios utilizados, sino los manipuladores, constituyendo un factor de riesgo crítico en la cadena alimentaria (Campos *et al.*, 2015; Rajaei *et al.*, 2021).

1.6.3 Utilización de microorganismos en la industria alimentaria.

Durante el proceso de producción de determinados productos alimenticios, se pueden añadir microorganismos que pueden contener genes de resistencia a los antimicrobianos. Según el efecto pretendido, estos microorganismos se pueden clasificar en cuatro grupos: cultivos iniciadores, probióticos, microorganismos bioconservadores y bacteriófagos. El problema importante es que estos microorganismos pueden contener de forma natural genes de resistencia a los antibióticos y no deberían usarse en animales ni en humanos, por lo tanto, deberían ser monitoreados cuidadosamente para su uso comercial.

En cultivos iniciadores se ha detectado que la resistencia a la tetraciclina es la más común, mientras que, entre las bacterias aisladas de alimentos fermentados espontáneamente, se han encontrado resistencias a vancomicina, tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol. En el caso de *Lactobacillus* aislados de quesos artesanales, así como en diferentes cepas de bifidobacterias probióticas, se ha mostrado una alta incidencia de resistencia a tetraciclina y eritromicina (Verraes *et al.*, 2013).

Los bacteriófagos pueden utilizarse para inactivar patógenos transmitidos por los alimentos. La literatura científica contiene descripciones del control de *L. monocytogenes* en quesos blandos y de *C. jejuni* y *Salmonella enteritidis* en piel de pollo por bacteriófagos, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Shigella* spp. y *Cronobacter sakazkii*, entre otros (Pérez Pulido *et al.*, 2016; Gray *et al.*, 2018; Ramos-Vivas *et al.*, 2021). La prevalencia de genes de resistencia a los antimicrobianos en los bacteriófagos se desconoce en gran medida. Sin embargo, diferentes estudios muestran que los bacteriófagos podrían ser reservorios ambientales de genes de resistencia a los antimicrobianos (Colomer-Lluch *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2022).

Es necesario asegurarse de que los microorganismos añadidos intencionalmente a los alimentos estén libres de genes transferibles de resistencia a los antimicrobianos. En los EEUU., los microorganismos que se añaden para fermentar alimentos se evalúan sobre la base del principio de calidad alimentaria o generalmente reconocido como seguro (GRAS: *Generally Recognised As Safe*) (Mattia y Merker, 2008). En Europa, esta evaluación se realiza sobre la base del concepto de *presunción calificada de seguridad* (QPS: *Qualified Presumption of Safety*), que incluye una lista de microorganismos que generalmente se consideran seguros para su uso. El estatus QPS se otorga a un grupo taxonómico particular de microorganismos utilizados en alimentos y piensos, sobre la base de la determinación de la identidad, la cantidad de conocimiento disponible, la posible patogenicidad y el uso final, y actualiza los criterios de resistencia a los antimicrobianos utilizados (EFSA, 2008; EFSA-BIOHAZ, 2021). En cuanto a los microorganismos que se añaden a los productos alimenticios, debe aplicarse el Reglamento CE N° 258/97 sobre nuevos alimentos (EFSA, 2007). El uso de bacteriófagos como aditivos alimentarios está prohibido, ya que hasta ahora no se ha autorizado ninguna aplicación dentro de la UE.

1.7 Control microbiológico de los alimentos y su tratamiento en la legislación alimentaria.

El cambio de la concepción moderna de la inocuidad de los alimentos de *reactiva* a *preventiva* ha llevado a los gobiernos de todo el mundo a moverse hacia enfoques basados en el control del riesgo, e involucrando a todos los partícipes en la cadena alimentaria en el control y seguridad de los alimentos. Esto en particular, requiere no sólo una legislación adecuada, sino también la

implantación de programas de inspección de alimentos, priorizando los controles en función de sus riesgos.

Este control oficial de alimentos puede considerarse una de las piedras angulares en la producción de alimentos inocuos y la promoción de la salud pública, pero su eficacia es algo que dependerá de los términos en que se realicen estos controles (Svrčinová y Janout, 2018).

La cuestión que se plantea es cómo llevar a la práctica esos controles. La aplicación más clara y concreta de la normativa debe apoyarse en la implantación de sistemas de vigilancia y control, de planes y procedimientos de muestreo y de análisis ajustados al Derecho Alimentario de la UE, siempre midiendo los riesgos en función del tipo de producto alimenticio con el que se trabaje. Las autoridades sanitarias, deben evaluar estos planes e implementar programas y mecanismos de control y de análisis de alimentos, al objeto de verificar el cumplimiento de la legislación vigente por parte de las empresas alimentarias en relación con estos aspectos (Radakovic, 2015).

Para llevar a cabo este compromiso, es necesario un marco de colaboración a nivel nacional e internacional, con roles y responsabilidades claros. Esta cooperación y colaboración entre autoridades competentes podría desempeñar un papel crucial en la eficacia del sistema de controles oficiales (FAO, 2010).

El Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria es el documento que describe los sistemas de control oficial a lo largo de toda la cadena alimentaria en España, desde la producción primaria hasta los puntos de venta al consumidor final. Es completo e integral, y describe las actuaciones de control oficial de las distintas Administraciones Públicas españolas (AESAN, 2019).

Dentro de este contexto, aspectos relativos a vigilancia de zoonosis y de resistencias a antimicrobianos, se recogen anualmente a nivel europeo en el

Informe de fuentes y tendencias de zoonosis, agentes zoonóticos y resistencia antimicrobiana. Para aplicar este control, se ha utilizado como base legal la *Decisión sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos*, de 12 de noviembre de 2013 (DOUE, 2013), sobre la cual se ha basado la realización de esta Tesis Doctoral. Tiene como objeto y ámbito de aplicación el seguimiento y la notificación, a partir de muestras de determinadas poblaciones animales destinados a la producción de alimentos y a partir de determinados alimentos, de las siguientes bacterias:

- Enterobacterias: *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, como indicador comensal.
- *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.
- Bacterias Gram positivas: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, también como indicador comensal.

Así como de la resistencia a los antibióticos que pudieran presentar.

En 2019, la EFSA publicó un informe científico en el que se recomendó realizar adaptaciones específicas al actual sistema de vigilancia, para garantizar la continuidad en la evaluación de las futuras tendencias de las resistencias a antimicrobianos a partir de 2021. Estas adaptaciones recomendadas se refieren principalmente a las poblaciones de animales productores de alimentos o a las categorías de alimentos que deben muestrearse, al diseño del muestreo que debe seguirse, a las especies bacterianas que deben someterse a ensayo para detectar las resistencias y a los métodos analíticos que deben utilizar los laboratorios encargados de los ensayos.

Teniendo en cuenta estas recomendaciones, y con el fin de adaptar los controles a los cambios que se han producido en la sociedad durante los

últimos años, la UE, no sólo derogó la decisión anterior a finales de 2020, sino que ha publicado la nueva *Decisión de Ejecución (UE) 2020/1729 de la Comisión de 17 de noviembre de 2020 relativa a la vigilancia y la notificación de la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias zoonóticas y comensales y por la que se deroga la Decisión de Ejecución 2013/652/UE de la Comisión [notificada con el número C(2020) 7894], - Diario Oficial de la Unión Europea, de 19-11-2020, vigente actualmente.*

2. OBJETIVOS

2 Objetivos

Teniendo en consideración la Decisión de la Unión Europea del 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos, *el Objetivo Principal* de este trabajo ha sido establecer la resistencia y multirresistencia a antimicrobianos de las diferentes cepas de microorganismos aisladas de alimentos en la provincia de Valencia durante el periodo comprendido entre 2014-2017.

Para alcanzar el objetivo general de este trabajo se abordaron los siguientes *objetivos específicos*.

- Determinar la prevalencia en alimentos de *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp. y *Enterobacter* spp., en la provincia de Valencia durante los años 2014 a 2017.
- Estudiar la sensibilidad o resistencia de los microorganismos aislados a diferentes antibióticos atendiendo a las recomendaciones de la normativa europea.
- Determinar la frecuencia y distribución de las resistencias o multirresistencias antimicrobianas, así como los patrones más frecuentes.
- Establecer la relación entre tipo de contaminación microbiana, resistencia y multirresistencia a antimicrobianos con el tipo de alimento.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3 Material y métodos

3.1 Toma de muestras, recepción en el laboratorio y conservación.

La toma de muestras se llevó a cabo por personal cualificado del Laboratorio de Salud Pública, siguiendo la normativa vigente para cada tipo de muestras.

3.1.1 Aguas.

Las muestras para el análisis microbiológico se obtuvieron a partir de pozos, fuentes, manantiales, ríos y de redes de abastecimiento público con o sin depósito intermedio, siguiendo las indicaciones establecidas en el Real Decreto 140/2003. Para asegurar la no contaminación con microorganismos exógenos de las muestras a analizar, estas se recogieron en frasco estéril, sin enjuagarse previamente, ni llenarlo en su totalidad, con el fin de dejar un espacio de aire antes de cerrarlo, evitar las contaminaciones accidentales y permitir la homogenización de la muestra antes del análisis.

A las muestras procedentes de aguas cloradas se les añadió tiosulfato sódico cristalizado según especificaciones de la norma UNE-EN-ISO 1948:2006 (Calidad del agua. Muestreo para el análisis microbiológico), con la finalidad de detener la acción del desinfectante y mantener viables los posibles microorganismos presentes en las mismas.

Para poder garantizar la calidad de los resultados de los análisis realizados en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, las muestras se llevaron al laboratorio dentro de las 24 h siguientes a su toma, junto con la solicitud de análisis cumplimentada (tres copias: una para el Laboratorio, otra para el Inspector Sanitario y la última para el Centro de Salud Pública), especificando los parámetros de análisis junto con una correcta identificación de la misma,

en donde se debía hacer constar: el municipio de recogida, código y nombre de infraestructura (pozos, depósitos, fuentes, puntos de red, etc), fecha de la toma de muestras, origen (red de abastecimiento, fuente, grifo, consumidor, etc.), punto de muestreo (salida de pozo, depósito, punto red, etc), temperatura, cloro libre residual detectado en ppm y reflejar si se había adicionado tiosulfato.

Para poder garantizar la calidad de los resultados de los análisis realizados en el laboratorio, las muestras se procesaron en el momento de llegada, siendo conveniente realizar la analítica antes de transcurridas 6 h desde la toma de muestras, pero pudiendo demorarse el análisis hasta 24 h, siempre y cuando la muestra fuera conservada en condiciones de refrigeración (2-8°C). Nunca congelándose para este tipo de análisis.

3.1.2 Alimentos.

En algunos casos los alimentos se recogieron en sus envases originales perfectamente cerrados, y en el caso de que las muestras fueran porciones, se utilizaron contenedores estériles de un tamaño adecuado y se tomaron en condiciones de asepsia, utilizando como método de referencia la norma ISO 18593:2013. En este caso, la fracción de alimento destinada al análisis microbiológico debía ser representativa de la totalidad de la muestra. Además, para determinar el número de unidades de muestras que debían ser recogidas, se utilizó como referencia el Anexo I del Reglamento nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los Criterios Microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Los tipos de alimentos utilizados se encuentran detallados en el Anexo II.

La admisión de estas muestras en la Unidad de Registro se supeditó al cumplimiento de los diferentes criterios establecidos para su aceptación: muestras correctamente identificadas, transporte y conservación adecuados, cantidad de muestra recibida suficiente para su análisis y un número de ejemplares ajustado a la legislación.

Si todo era correcto, la muestra se llevaba a las unidades funcionales para proceder a su análisis. En el caso de una verificación incorrecta, la Unidad de Registro se ponía en contacto con el inspector sanitario, responsable de la toma de muestra, para que diese su conformidad a la anulación de la misma.

Estas muestras, si procedían de alimentos perecederos no congelados, se procesaron, en el momento de llegada al laboratorio, y si no era posible realizar el análisis en un plazo menor a 6 h, se conservaron en refrigeración (2-8°C) hasta un máximo de 24 h. En el caso de alimentos perecederos congelados, se mantuvieron en congelación hasta el momento del análisis.

Si se trataba de alimentos no alterables, se almacenaron a temperatura ambiente (15-30°C), protegidos de la humedad y de fuentes de contaminación hasta su análisis, y siempre antes de su fecha de caducidad.

3.2 Procesado de las muestras.

3.2.1 Aguas.

Siguiendo Real Decreto 902/2018, de 20 de julio, por el que se modifican el Real Decreto 140/2003, para abastecimiento y control de calidad de agua potable de consumo público establece, como análisis microbiológicos a realizar, las determinaciones de coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales, así como el número de cada una de ellas.

Según esta normativa, para la detección de microorganismos a partir de las muestras de agua se utilizó el método de filtración por membrana. Esta técnica se basa en hacer pasar la muestra de agua problema mediante vacío a través de un filtro de membrana microporosa con un tamaño de poro de 0.45 micras, y manteniendo siempre las condiciones de esterilidad necesarias para evitar la contaminación de la muestra con microorganismos exógenos.

Este método permite analizar muestras con volúmenes relativamente grandes, quedando retenidos los microorganismos sobre la membrana. Posteriormente el filtro fue colocado en un medio de cultivo específico para el microorganismo o tipo de microorganismos que se desea determinar en la muestra, incubando durante 24 h a 37°C para la búsqueda de coliformes totales y *E. coli* y para estreptococos fecales durante 48 h a 37°C.

3.2.2 Alimentos.

Debido a la falta de homogeneidad en la distribución de los microorganismos en un gran número de alimentos, en general el procedimiento comúnmente empleado para el aislamiento y recuento de los microorganismos consiste en la preparación de una suspensión homogénea de alimento, y por lo tanto de microorganismos, que permita la preparación de las diluciones que posteriormente podrán ser utilizadas en diversos métodos de recuento. Para la preparación de esta suspensión inicial, los diluyentes utilizados fueron solución de peptona, solución salina de peptona y agua de peptona tamponada (Anexo I).

La homogenización de las diferentes muestras, utilizando siempre el peso o volumen determinado en la legislación, se consiguió con homogenizadores peristálticos tipo *Stomacher*, realizándose posteriormente diluciones seriadas,

destinadas a reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, tras la siembra e incubación, la observación de cualquier crecimiento tanto en medios líquidos o en medios sólidos (recuento de viables).

Además, según el tipo de alimento a analizar se realizaron una serie de manipulaciones previas con el fin de garantizar la idoneidad del análisis:

- **Alimentos congelados:** se descongelaron antes de su procesamiento, a temperatura ambiente durante 3 h como máximo o a temperatura de refrigeración (2-8°C) un máximo de 24 h.
- **Alimentos ácidos:** se ajustaron a un pH neutro usando diluyentes con un indicador de pH incorporado, evitando así, la necesidad de emplear y esterilizar sondas de pH.
- **Productos con alto contenido en grasa:** se utilizaron agentes surfactantes para la preparación del alimento con alto contenido en grasa (más del 20% del alimento), como Tween 80 (entre 1g/L hasta 10g/L) teniendo en cuenta los niveles de grasa.

El tiempo transcurrido desde el momento en el que se terminó de preparar la suspensión inicial y el instante en el que el inóculo entraba en contacto con los medios de cultivo, no debía superar los 45 min, limitándose a 30 min el tiempo entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las siguientes diluciones decimales.

3.3 Aislamiento e identificación de microorganismos.

El aislamiento y la identificación de los microorganismos provenientes de las diferentes muestras, se llevó a cabo siguiendo los procedimientos internos

desarrollados en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia y acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación según la norma ISO 17025:2017, utilizando diferentes técnicas dependiendo de si las muestras eran aguas de consumo humano o alimentos. La composición de los diferentes medios de cultivo se encuentra en el Anexo I.

3.3.1 *Salmonella* spp.

Para el aislamiento e identificación de estos microorganismos se siguió la norma ISO 6579-3:2014. En primer lugar, se preparó una suspensión inicial de muestra en agua de peptona tamponada siguiendo las instrucciones del procedimiento de preparación y homogenización de muestras de los alimentos realizados por el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, teniendo en cuenta en cada caso la cantidad de muestra requerida según la legislación vigente, e incubándose a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 h.

Posteriormente, se procedió a un enriquecimiento en medios selectivos cultivando 1 ml de la solución anterior en 10 ml de caldo de Muller Kauffmann ($37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 h) y sembrando 0,1 ml del mismo cultivo anterior en medio de Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) ($41,5\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 h).

A partir de los cultivos obtenidos por enriquecimiento en ambos medios, se realizó una siembra para aislamiento en dos medios sólidos selectivos: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Chromagar para *Salmonella*. Se tuvo en cuenta que las colonias presuntivas de *Salmonella* procedentes de MSRV presentan un halo opaco alrededor de la zona de crecimiento. Los cultivos se incubaron a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 h. Posteriormente, se examinaron las placas para detectar las colonias sospechosas. Las colonias típicas procedentes de

agar XLD presentaron centro negro y una zona alrededor ligeramente transparente de color rojizo y las procedentes de agar cromogénico fueron de color rosa pálido a malva.

3.3.2 *Escherichia coli*.

3.3.2.1 Aguas.

El aislamiento de las cepas de *E. coli* procedentes de aguas de consumo humano se realizó por siembra en agar nutritivo y agar Triptona-Bilis-X-Glucurónico (TBX) a partir de los pocillos positivos de *E. coli* utilizados para el recuento del mismo mediante la técnica del Número Más Probable (NMP), siguiendo un procedimiento interno del Laboratorio de Salud Pública de Valencia basado en la Norma ISO 9308-2:2012 (Water quality- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria- Part 2: Most probable number method).

Este método es una prueba diseñada específicamente para el recuento de bacterias coliformes indicadoras de contaminación fecal a partir de muestras de agua, y es aplicable a todo tipo de aguas destinadas al consumo humano. Se basa en la Tecnología de Sustrato Definido (DST) que permite detectar de forma simultánea coliformes totales y *E. coli*.

El método DST emplea nutrientes indicadores, es decir, reactivos que provocan cambios de coloración en las muestras de agua sometidas a estudio:

- a. Coliformes totales: metabolizan el sustrato cromogénico ortonitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG) gracias a la actividad de su enzima β -galactosidasa; la escisión del onitrofenol provoca un paso de coloración de transparente a amarillo.

- b. *E. coli*: esta bacteria también tiene capacidad de metabolizar ONPG y, además, metaboliza específicamente el sustrato fluorogénico 4-metil-umbelliferil β -D-glucurónico. Su enzima β -glucuronidasa provoca la ruptura del enlace que libera a la molécula de 4-metil-umbelliferona, responsable de producir fluorescencia, responsable del color azul-verdoso de las colonias.

Este método permitió la detección simultánea de estas bacterias en 18 h. Posteriormente, tal y como se ha indicado, el aislamiento de las cepas de *E. coli* se realizó por siembra en agar nutritivo y agar TBX a partir de los pocillos positivos de *E. coli*.

3.3.2.2 Alimentos.

El aislamiento de las cepas de *E. coli* procedentes de alimentos se realizó siguiendo dos procedimientos internos del Laboratorio de Salud Pública de Valencia:

- Procedimiento de recuento: basado en la Norma ISO 16649-2: 2001 (crecimiento a 44°C).
- Procedimiento de detección: basado en la Norma ISO 16649-3: 2005. (β -D-glucuronidasa positivas). La β -D-glucuronidasa es una de las enzimas que sirve como indicador para *E. coli*, ya que está presente en el 94-96% de las cepas de esta especie.

Para la determinación cuantitativa en placa, se realizó una siembra directa del alimento si era líquido, o de la solución madre y/o de las diluciones decimales correspondientes dependiendo del límite de legal establecido para el alimento analizado, en una placa a la que se le adiciona agar TBX atemperado. Las placas se incubaron a $44\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Tras la incubación, se

examinaron las placas para determinar el recuento de colonias características que aparecían de color azul verdoso.

Una vez aisladas las distintas cepas de *E. coli* a partir de aguas de consumo humano o bien de alimentos, se conservaron en una solución de caldo nutritivo número dos adicionada de glicerol al 25% y en congelación a $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$.

3.3.3 *Campylobacter* spp.

La determinación de la presencia de estos microorganismos sólo se realizó en alimentos, mediante el procedimiento basado en la norma ISO 10272-1:2017. En primer lugar, se preparó la suspensión inicial del alimento a la dilución 1/10 en caldo Bolton siguiendo las instrucciones del procedimiento de preparación y homogenización de muestras de los alimentos realizados por el Laboratorio de Salud Pública de Valencia y depositándola en contenedores estériles de 250 ml de capacidad.

Posteriormente se realizó el enriquecimiento selectivo de la muestra y para ello se incubó la solución madre en caldo Bolton a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de entre 4 y 6 h seguido de otra incubación a $41\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 ± 4 h y siempre en condiciones de microaerofilia.

Por último, se procedió a el aislamiento y selección e identificación de los microorganismos. Para ello se homogenizó el cultivo en caldo Bolton y se sembró en agar Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón modificado (mCCD) y en agar Skirrow. Se incubaron las placas a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h en condiciones de microaerofilia, examinándolas para determinar las colonias sospechosas de pertenecer a *Campylobacter* (blanco-grisáceas en agar mCCD y cremosas-pardas en agar Skirrow), a veces con tendencia a extenderse o difundir por el medio.

Posteriormente se seleccionaron de tres a cinco colonias sospechosas para su confirmación, sembrándose en agar sangre e incubando a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h. Para confirmar la presencia de *Campylobacter* se eligió una colonia al azar y se investigaron las siguientes características: presencia de la enzima citocromo-oxidasa, morfología y movilidad del microorganismo y crecimiento negativo a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 ± 4 h en microaerobiosis y a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 ± 4 h en atmósfera aerobia.

3.3.4 *Enterococcus* spp.

Basándonos en la norma ISO 7899:2001, el aislamiento de enterococos se realizó sólo a partir de muestras de agua de consumo humano, utilizándose el método de filtración en membrana descrito anteriormente. Posteriormente, se transfirió la membrana filtrante a una placa de Petri con agar Slanetz-Bartley y se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 ± 4 h. Finalmente se procedió al recuento de colonias que mostraron color rojo, marrón o rosado, en el centro o en toda la colonia. Con el fin de confirmar los enterococos, se transfirió la membrana con las colonias crecidas en el medio Slanetz-Bartley a medio Agar-Bilis-Esculina con azida previamente calentado, incubándose a $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 2 h.

3.4 Identificación de microorganismos mediante el sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics).

El sistema Thermo Scientific Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics) utiliza una técnica fluorimétrica de lectura de placas automatizada. Se utilizaron dos

tipos de placas diferentes: GNID (bacterias Gram negativas) y GPID (bacterias Gram positivas) compuestas por tres secciones, cada una de las cuales contiene treinta y dos pruebas bioquímicas secas. Las pruebas incluyen medios bioquímicos clásicos reformulados para su lectura fluorométrica con sustratos fluorogénicos.

Se resuspendieron entre tres y cinco colonias de cada tipo de microorganismo, procedentes de un cultivo puro, en cinco ml de agua desmineralizada, con el fin de alcanzar el 0,5 de la escala McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC./ml), midiendo la concentración con el nefelómetro Sensititre®.

Una vez ajustada la densidad de la suspensión, se transfirió el volumen correspondiente a la placa GNID, si se trataba de *Salmonella* spp., *E. coli* o *Campylobacter* spp. y, a la placa GPID, si se trataba de *Enterococcus* spp. A continuación, las placas se llevaron a incubar a 34-36°C, leyéndose transcurridas de cinco a dieciocho horas en el sistema Thermo Scientific Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics) OptiRead®. Los datos son analizados por el programa de ordenador Swin® para generar los informes.

3.5 Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos.

La determinación de resistencias a antimicrobianos de los diferentes microorganismos se realizó siguiendo la técnica de dilución con arreglo a los métodos descritos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), aceptados como método de referencia internacional (norma ISO 20776-1:2006).

En el análisis de las resistencias de los distintos microorganismos a los diferentes antimicrobianos, se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos,

en lugar de los clínicos, pues en este estudio no se evaluó la capacidad o no de producir enfermedad en el hospedador, sino que únicamente se pretendió separar para cada especie la subpoblación que carece de mecanismos de resistencia adquiridos (fenotipo salvaje) de la que sí tiene dichos mecanismos.

Los antibióticos ensayados para cada microorganismo se encontraban establecidos en el Diario Oficial de la Unión Europea 2013/652/UE y fueron los siguientes: ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacino, cloranfenicol, colistina, gentamicina, meropenem, ácido nalidíxico, tetraciclina, trimetoprim, y tigeciclina para *Salmonella* spp. y *E. coli*, mientras que para *Campylobacter* spp. se utilizaron: ciprofloxacino, eritromicina, estreptomicina gentamicina, ácido nalidíxico y tetraciclina. Por otro lado, para enterococos, se utilizaron: ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacino, daptomicina, eritromicina, gentamicina, linezolid, quinupristin/dalfopristin, tetraciclina, tigeciclina, teicoplanin y vancomicina.

Se trabajó siempre con cultivos puros y frescos (18-48 h) de los microorganismos a ensayar, crecidos en un medio de cultivo sólido, no selectivo y en el que se podían observar colonias aisladas. Para llevar a cabo el estudio se utilizó el sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics) utilizando placas específicas que se componen de noventa y seis pocillos, los cuales llevan integrados los antibióticos deshidratados, y con unos rangos de dilución determinados, adaptados a los puntos de corte EUCAST.

El proceso seguido fue el descrito por el fabricante. Se resuspendieron entre tres y cinco colonias de cada tipo de microorganismo, procedentes de un cultivo puro según las condiciones descritas anteriormente, en 5 ml de agua desmineralizada o caldo Mueller-Hinton (en el caso de *Campylobacter* spp.),

con el fin de alcanzar el 0,5 de la escala McFarland (equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml), midiendo la concentración con el nefelómetro *Sensititre*®.

Una vez ajustada la densidad de la suspensión, se transfirió el volumen correspondiente a un tubo con caldo Mueller-Hinton (en el caso de *Campylobacter* spp., fue suplementado con sangre lacada de caballo), obteniendo así una concentración final aproximada de 10^5 U.F.C./ml., confirmándose a continuación que se trataba de un cultivo puro.

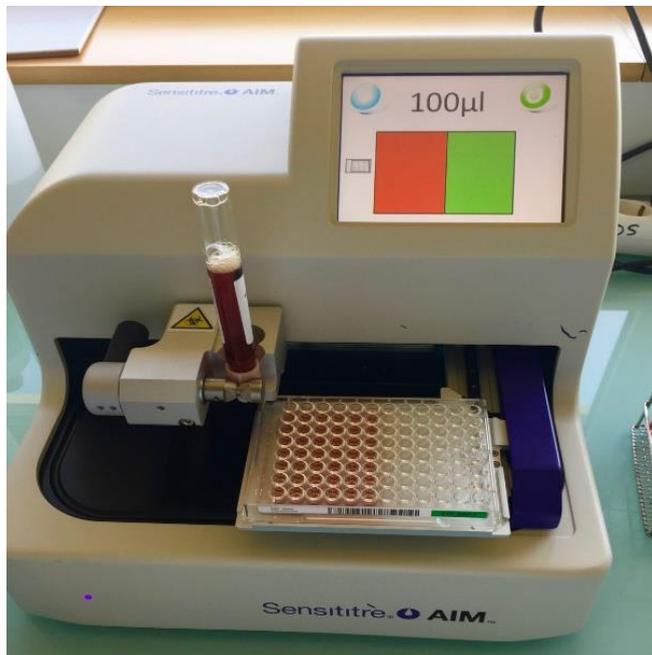


Figura 5. Sensititre® Automated Inoculation Delivery System

Posteriormente se procedió a la inoculación de las placas correspondientes, utilizando los cabezales desechables suministrados por el fabricante, con el equipo *Sensititre*® *Automated Inoculation Delivery System* (Figura 5),

seleccionando en el visor del inoculador los parámetros correspondientes al microorganismo que estábamos analizando. Este inoculador permite diferentes posibilidades, por un lado, el volumen que se quiere dispensar en cada pocillo y, por otro lado, la distribución de muestras en la placa (una o más cepas por placa).

Al terminar la dispensación, se cubrió la placa con una lámina adhesiva para evitar la evaporación y contaminación de la muestra y se incubó durante 24 h a 37°C.

Tabla 1. Cepas de microorganismos de referencia utilizadas para control interno según Norma ISO 11133:2014.

CEPAS DE REFERENCIA	
	CECT
<i>Enterococcus faecalis</i>	795
<i>Enterococcus faecalis</i>	481
<i>Enterococcus faecium</i>	410
<i>Enterococcus faecium</i>	8224
<i>Escherichia coli</i>	516
<i>Escherichia coli</i>	434
<i>Escherichia coli</i>	943
<i>Salmonella entérica</i>	4300

CECT: Colección Española de cultivos Tipo

El control interno para asegurar el correcto funcionamiento del sistema se realizó siguiendo las recomendaciones y cepas de referencia descritas en la norma ISO 11133:2014 (Tabla 1).

La lectura de las placas se realizó con el equipo *Sensititre Vizion® System*, transfiriendo la información al programa de ordenador *Swin®* (Fig. 6).



Figura 6. Sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics).

3.6 Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido.

La detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), fue llevada a cabo en cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* presuntamente productoras de estas enzimas (resistentes a la cefotaxima o a la ceftazidima), y se realizó siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Cercenado y Cantón, 2011), mediante las técnicas de: i) sinergia de doble disco; ii) discos combinados con inhibidor y iii) E-test.

Su detección se basó en la capacidad de estas enzimas de ser inhibidas por el ácido clavulánico utilizando como indicadores cefalosporinas de tercera y cuarta generación y aztreonam. Como medio de cultivo se utilizó agar Mueller-Hinton.

Los antimicrobianos utilizados para las pruebas de sinergia de doble disco, venían dados en discos, siguiendo las recomendaciones del CLSI, y fueron los siguientes:

- Amoxicilina-ácido clavulánico 20/10 µg
- Aztreonam 30 µg
- Cefepima 30 µg
- Cefotaxima 30 µg
- Ceftazidima 30 µg

Para la realización de la técnica de discos con inhibidor se utilizaron los siguientes antimicrobianos en disco:

- Ceftazidima-ácido clavulánico 30/10 µg
- Cefotaxima-ácido clavulánico 30/10 µg
- Cefepima-ácido clavulánico 30/10 µg

En el ensayo de difusión en gradiente se utilizaron tiras E-test ESBL (bioMérieux) que contenían:

- Cefepima (0,25-16 µg/ml)/Cefepima (0,064-4 µg/ml) + 4 µg/ml de ácido clavulánico
- Ceftazidima (0,5-32 µg/ml)/Ceftazidima (0,064-4 µg/ml) + 4 µg/ml de ácido clavulánico
- Cefotaxima (0,25-16 µg/ml)/Cefotaxima (0,016-1 µg/ml) + 4 µg/ml de ácido clavulánico

Técnica de sinergia de doble disco

Para la realización de este ensayo se sembraron las cepas a estudiar en agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. A continuación, se situaron los discos con aztreonam, cefepima, cefotaxima y ceftazidima a una distancia de 20-25mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina-ácido clavulánico. y se incubó a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 h.

Técnica de discos combinados con inhibidor

Las cepas problema se sembraron siguiendo el mismo protocolo que en el caso anterior. Posteriormente se colocaron los discos combinados y se incubó a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 h.

E-test

Tras inocular los microorganismos problema en una placa con agar Mueller-Hinton, se aplicaron las tiras enumeradas anteriormente sobre la superficie incubándose a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 h.

El control de calidad se realizó con las cepas *E. coli* CECT 434 (control negativo) y *Klebsiella pneumoniae* CECT 7787 (control positivo).

3.7 Detección de betalactamasas tipo AmpC.

Las cepas de *Salmonella* spp. o de *E. coli*, presuntamente productoras de betalactamasas tipo AmpC (resistentes a la cefotaxima o a la ceftazidima), se analizaron mediante la técnica de discos combinados con inhibidor. El estudio se realizó siguiendo el procedimiento de siembra estándar de un antibiograma por difusión, y se colocaron discos con ceftazidima (30 μg), ceftazidima-

cloxacilina (30/500 µg), cefotaxima (30 µg), y cefotaxima-cloxacilina (30/500 µg), incubándose a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas.

El control de calidad se realizó con la cepa *E. coli* CECT 434 (control negativo).

3.8 Análisis de datos estadísticos.

En este análisis se estudió la relación entre dos variables cualitativas haciendo un modelo lineal generalizado. Una variable, la procedencia de las diferentes cepas de los cuatro microorganismos estudiados y la otra variable, la resistencia a cada uno de los antibióticos estudiados, para lo que se utilizó la prueba de chi-cuadrado, y para el análisis se utilizó un programa estadístico denominado *IBM SPSS Statistics versión 25* (IBM Cop., Armonk, NY. 2017), por el cual se adquirieron los datos estadísticos y posteriormente se generaron las tablas descriptivas y los análisis estadísticos posteriores.

Para comprobar si existe relación significativa entre la resistencia de los diferentes microorganismos estudiados a los antibióticos y el origen de la muestra, se realizó un análisis estadístico considerando la existencia de relación significativa cuando el valor-p sea igual o inferior a 0,05. El análisis se realizó por duplicado (réplicas biológicas) para aquellos antibióticos para los que se obtuvo, al menos, una cepa resistente.

3.9 Determinación del Índice de Multirresistencia.

El Índice de Multirresistencia (IM) se determinó dividiendo el número de antimicrobianos a los que un aislado es resistente entre el número de antimicrobianos utilizados en el estudio (Krumperman, 1983).

4. RESULTADOS

4 Resultados

El Diario Oficial de la Unión Europea de 12 de noviembre de 2013, recoge la *Decisión sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos (2013/652/UE)*, sobre la cual se ha basado la realización de esta Tesis Doctoral. Como se ha indicado anteriormente, esta normativa tiene como objeto y ámbito de aplicación el seguimiento y la notificación, a partir de muestras de determinadas poblaciones animales destinados a la producción de alimentos y a partir de determinados alimentos, de las siguientes bacterias:

- Enterobacterias: *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, como indicadores comensales.
- *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.
- Bacterias Gram positivas: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, también como indicadores comensales.

4.1 *Salmonella* spp.

4.1.1 Estudio de la presencia de *Salmonella* spp. en alimentos.

Siguiendo el protocolo de aislamiento e identificación de microorganismos del género *Salmonella* descrito en Material y Métodos, durante el periodo comprendido entre enero de 2014 y abril de 2016 se realizaron controles a un total de siete mil quinientas cuarenta y una muestras provenientes de productos alimenticios de la provincia de Valencia, destinadas a la detección de este género de microorganismos (Anexo II). Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, aislándose e identificándose un

total de noventa y una cepas de *Salmonella* spp. es decir, tan solo un 1,2% del total (Tabla 2) y, que posteriormente, fueron confirmadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia (Univèrsitat de Valencia) mediante la utilización del sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre®.

Tabla 2. Número y porcentaje de muestras positivas en *Salmonella* spp. durante el periodo comprendido entre enero de 2014 y abril de 2016 para cada tipo de alimento.

Alimentos	n+/n	%
Carne fresca de ave	11/338	3,25
Preparados de ave	15/375	4
Carne fresca de ganado	9/203	4,43
Preparados de ganado	48/1763	2,72
Moluscos y pescado	7/475	1,26
Frutas y hortalizas frescas	0/65	0
Preparados de frutas y hortalizas	1/2844	0,03
Lácteos	0/896	0
Huevos frescos	0/582	0
Total	91/7541	1,2

n+/n, relación entre el número de muestras positivas en *Salmonella* spp. y el número de muestras analizadas según tipo de alimento.

El tipo de alimentos de los que procedían las muestras queda reflejado en la Tabla 2. Analizada la presencia de *Salmonella* spp. en los diferentes grupos de alimentos, se pudo observar que la incidencia de contaminación fue muy similar en todos los alimentos estudiados, siendo mayor en las muestras procedentes de carne fresca de ganado (4,43%) y preparados de ave (4%), seguida de carne fresca de ave (3,25%) y preparados de ganado (2,72%),

encontrando la más baja en las muestras procedentes de moluscos y pescado, que alcanzó un 1,26%.

Por otra parte, no se detectó presencia de *Salmonella* spp. en productos lácteos y ovoproductos ninguno de los años estudiados, y tan solo se determinó una muestra positiva en preparados de frutas y hortalizas, a pesar de que el número de muestras estudiadas de este tipo de alimentos era el más elevado (Tabla 2).

4.1.2 Estudio de la resistencia de *Salmonella* spp. a los antibióticos.

Una vez aisladas las cepas de *Salmonella* spp. de los diferentes alimentos estudiados, se procedió a realizar el análisis de las resistencias a los antibióticos marcados en la legislación, tal y como se detalla en Material y Métodos y realizando el estudio agrupando las cepas según el tipo de alimento del que procedían (Tablas 3-7).

Tabla 3. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de carne fresca de ave.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
62	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
65	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
66	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
67	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
72	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
73	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
75	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
76	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
85	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
86	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	0,08	-
87	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	0,08	-
R	0	0	0	0	9	0	0	0	11	0	0	0	-	-
% R	-	-	-	-	82	-	-	-	100	-	-	-	-	-

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim

% R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

El análisis de la resistencia a antimicrobianos de las distintas cepas de *Salmonella* spp. procedentes de carne fresca de ave, nos indicó, como se observa en la Tabla 3, que todas las cepas fueron altamente resistentes a los antimicrobianos del grupo de las quinolonas, el 100% al ácido nalidíxico y el 82% al ciprofloxacino. No se encontró ninguna resistencia al resto de los antibióticos o grupos de antibióticos ensayados. El IM fue menor a 0,2 en todos los casos y no se encontraron cepas multirresistentes.

Las muestras obtenidas de carne fresca de ganado (Tabla 4), presentaron porcentajes de resistencia elevados a la tetraciclina (67%) y a la ampicilina (56%), en menor medida al cloranfenicol y a la colistina (22% en ambos casos), mientras que la resistencia al ácido nalidíxico, al ciprofloxacino y al trimetoprim sólo alcanzó un 11%.

Tabla 4. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de carne fresca de ganado.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
1	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	0,41	+
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
11	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	0,33	+
12	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	0,25	-
53	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
78	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
83	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
88	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	0,08	-
89	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
R	5	0	0	2	1	2	0	0	1	6	0	1	-	2
% R	56	-	-	22	11	22	-	-	11	67	-	11	-	22

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim

% R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

De las nueve cepas aisladas en este grupo, dos presentaron multirresistencia, una presentó resistencia a cinco de los antibióticos ensayados pertenecientes a cuatro clases (penicilinas, anfenicoles, quinolonas y tetraciclinas) mientras

que otra presentó resistencia a cuatro de los doce antibióticos estudiados de cuatro clases (penicilinas, anfenicoles, tetraciclinas y pirimidinas). Cabe destacar que tres de las cepas, la 1, 11 y 12, tuvieron un IM superior a 0,2, alcanzando una de ellas un índice de 0,41 y las otras un 0,33 y un 0,25, mientras que el resto no superó un índice del 0,16.

Las cepas de *Salmonella* spp. procedentes de preparados de ave (Tabla 5), revelaron principalmente resistencia a las quinolonas, tanto al ciprofloxacino como al ácido nalidíxico, con un 27% a ambos antibióticos. En menor medida los microorganismos presentaron resistencia a la ampicilina (20%) y a la tetraciclina (13%).

Tabla 5. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de preparados de ave.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
30	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
54	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
55	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
56	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
57	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
58	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
59	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
60	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
77	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
79	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
80	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
81	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
82	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
84	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
90	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
R	3	0	0	0	4	0	0	0	4	2	0	0	-	-
% R	20	-	-	-	27	-	-	-	27	13	-	-	-	-

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
% R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

Hay que destacar que ninguno de los microorganismos analizados mostró resistencia a más de dos antimicrobianos: cuatro cepas (27%) fueron resistentes a las quinolonas, dos cepas presentaron resistencia a la ampicilina

y la tetraciclina (13%) y solo una fue resistente únicamente a la ampicilina (7%), lo que implica que el 53% de los microorganismos estudiados fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados. El IM fue inferior a 0,2 en todos los casos y no se encontraron cepas multirresistentes.

En cuanto a las cepas de *Salmonella* spp. procedentes de preparados de ganado (Tabla 6), las cuarenta y ocho cepas aisladas fueron sensibles a las cefalosporinas de tercera generación, tanto cefotaxima como ceftazidima, a la colistina, gentamicina, meropenem y tigeciclina. Los mayores porcentajes de resistencia se encontraron a la tetraciclina, siendo del 85%, seguido de la ampicilina con un 63%. En menor medida los microorganismos presentaron resistencia al trimetoprim (19%) seguido del cloranfenicol (15%) y, por último, al ciprofloxacino y ácido nalidíxico (10%).

Es muy importante matizar que doce de las cepas fueron multirresistentes, de las cuales tres presentaron resistencia a seis de los doce antibióticos estudiados (IM=0,5), y otras nueve fueron resistentes a tres de los doce antibióticos ensayados (IM=0,25).

Presentaron resistencias a dos de los antibióticos veinte de los microorganismos estudiados, destacando el hecho de que en dieciséis aislados se produjo la resistencia conjunta a la ampicilina y la tetraciclina. Por otro lado, cuatro cepas fueron sensibles a todos los antibióticos, mientras que trece cepas presentaron resistencia a un único antibiótico, mayoritariamente a la tetraciclina (Tabla 6).

Tabla 6. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de preparados de ganado.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,25	+
6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,25	+
7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,25	+
8	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,25	+
9	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
14	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	0,25	+
15	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	0,25	+
16	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	0,25	+
17	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	0,25	+
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
26	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
27	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
28	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
29	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
31	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
32	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
33	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
34	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
35	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,25	+
36	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	0,5	+
37	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	0,5	+
38	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	0,5	+
39	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
40	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
41	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
42	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
43	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
44	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
45	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
46	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
47	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,16	-
49	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,16	-
50	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
51	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
52	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
61	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
R	30	0	0	7	5	0	0	0	5	41	0	9	-	12
% R	63	-	-	15	10	-	-	-	10	85	-	19	-	25

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidixico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim

% R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

En relación con las cepas aisladas de moluscos y pescado (Tabla 7), la mayor resistencia detectada fue al ciprofloxacino y a la tetraciclina, con un 57%, seguido de la resistencia a la ampicilina (43%). Por último, para un total de siete cepas aisladas en este grupo, dos de las cepas fueron multirresistentes ya que presentaron resistencia a tres y cuatro grupos farmacológicos distintos (penicilinas, quinolonas y tetraciclina en uno de los casos, y además a las pirimidinas en el otro). Con respecto al IM, una de las cepas alcanzó un 0,33 y otra el 0,25, mientras que el resto no superó el 0,16.

Tabla 7. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de moluscos y pescado.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
63	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
64	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
68	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	0,25	+
69	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	0,33	+
70	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
71	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
74	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
R	3	0	0	0	4	0	0	0	1	4	0	1	-	2
% R	43	-	-	-	57	-	-	-	14	57	-	14	-	28

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
% R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

De modo general, y analizando de forma individualizada cada antimicrobiano, como se observa en la Figura 7, los antibióticos a los que más resistencias presentaron los microorganismos fueron, en primer lugar, la tetraciclina (59%) y, en segundo lugar, la ampicilina (46%). En menor medida aparecieron resistencias al ciprofloxacino (26%), al ácido nalidíxico (24%), al trimetoprim (12%) y al cloranfenicol (10%). El 100% de las cepas estudiadas

presentaron sensibilidad a la cefotaxima, ceftazidima, gentamicina, meropenem y tigeciclina, mientras que el 98% lo hicieron a la colistina.

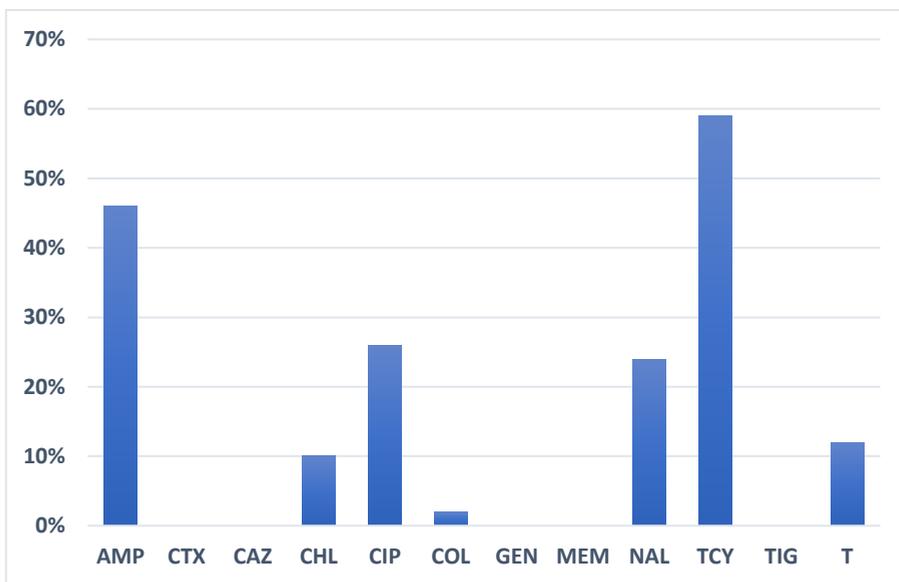


Figura 7. Resistencia de *Salmonella* spp. a los antibióticos ensayados.

Teniendo en cuenta el origen de la muestra (Tabla 8), en la carne fresca de ave, se detectaron resistencias muy altas al ácido nalidíxico y al ciprofloxacino (82% y 100% respectivamente), y fueron de un 26,6% para ambos antibióticos en los preparados de aves, apareciendo también resistencias a la ampicilina (20%) y a la tetraciclina (13,3%). Tanto los en los microorganismos procedentes de carne fresca de ganado, como en los preparados de esa misma carne, se encontraron resistencias muy altas a la ampicilina (55,5% y 62,5%) y a la tetraciclina (66,6% y 85,4%), mientras que, en las muestras obtenidas a partir de moluscos y pescado, las resistencias se asociaron al ciprofloxacino y la tetraciclina (57,1% en ambos casos), a la ampicilina (42,8%) y al ácido nalidíxico y a la tigeciclina (14,3%).

Tabla 8. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp. según el origen de la muestra.

	Carne fresca de ave n ⁺ /n (%)	Carne fresca de ganado n ⁺ /n (%)	Preparados de ave n ⁺ /n (%)	Preparados de ganado n ⁺ /n (%)	Moluscos y pescado n ⁺ /n (%)	Valor-p
AMP	0/11 (0)	5/9 (55,5)	3/15 (20)	30/48 (62,5)	3/7 (42,8)	<0,001
CTX	0/11 (0)	0/9 (0)	0/15 (0)	0/48 (0)	0/7 (0)	-
CAZ	0/11 (0)	0/9 (0)	0/15 (0)	0/48 (0)	0/7 (0)	-
CHL	0/11 (0)	2/9 (22,2)	0/15 (0)	7/48 (14,6)	0/7 (0)	0,059
CIP	9/11 (81,8)	1/9 (11,1)	4/15 (26,6)	5/48 (10,4)	4/7 (57,1)	<0,001
COL	0/11 (0)	2/9 (22,2)	0/15 (0)	0/48 (0)	0/7 (0)	0,047
GEN	0/11 (0)	0/9 (0)	0/15 (0)	0/48 (0)	0/7 (0)	-
MEM	0/11 (0)	0/9 (0)	0/15 (0)	0/48 (0)	0/7 (0)	-
NAL	11/11 (100)	1/9 (11,1)	4/15 (26,6)	5/48 (10,4)	1/7 (14,3)	<0,001
TCY	0/11 (0)	6/9 (66,6)	2/15 (13,3)	41/48 (85,4)	4/7 (57,1)	<0,001
TIG	0/11 (0)	0/9 (0)	0/15 (0)	0/48 (0)	0/7 (0)	-
T	0/11 (0)	1/9 (11,1)	0/15 (0)	9/48 (18,7)	1/7 (14,3)	0,075

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
n: total de aislados; n⁺: total de aislados resistentes.

El valor-p en el caso de la ampicilina, el ciprofloxacino, el ácido nalidíxico, la colistina y la tetraciclina, fue inferior a 0,05, lo que indicó diferencias significativas en relación con el origen de la muestra y estos antibióticos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el caso del cloranfenicol y el trimetoprim ($p > 0,05$).

Analizando el número de resistencias de las diferentes cepas de *Salmonella* spp. a los distintos grupos de antibióticos, teniendo en cuenta el tipo de alimento de procedencia (Tabla 9), se puede observar que, de las quince cepas sensibles a todos los antibióticos, ocho procedían de preparados cárnicos de ave, cuatro de preparados cárnicos de ganado, dos de carne fresca de ganado y una de moluscos y pescado.

Tabla 9. Número de resistencias de las cepas de *Salmonella* spp. a los diferentes grupos de antibióticos en relación con su origen.

Nº de resistencias	Carne fresca de ave	Carne fresca de ganado	Preparados de ave	Preparado de ganado	Moluscos y pescado	Total
0	0	2	8	4	1	15
1	2	2	1	12	2	19
2	9	2	6	20	2	39
3	0	1	0	9	1	11
4	0	1	0	1	1	2
5	0	1	0	0	0	1
6	0	0	0	3	0	3

Diecinueve cepas presentaron resistencia a un solo antibiótico, con una mayor incidencia en los aislados de preparados cárnicos de ganado. La resistencia a dos antibióticos se presentó en treinta y nueve cepas, mayoritariamente en las aisladas a partir de los preparados cárnicos de ganado, y destacando el patrón de resistencias AMP/TCY, en veinticinco de los casos analizados, mientras que trece presentaron el patrón CIP/NAL (datos no mostrados en tablas).

La Figura 8 muestra la distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos antibióticos, de *Salmonella* spp. En total, quince de los aislados fueron sensibles a todos los antibióticos (16,7%), treinta y tres presentaron resistencia a una familia de antibióticos (36,6%), y veintiséis a dos familias (28,9%). El resto de aislados (17,8%), fueron multirresistentes. De los aislados multirresistentes, el 62,5% fueron resistentes a tres clases de antibióticos y el 18,75% fueron resistente a cuatro y cinco clases de antibióticos. No encontrándose ninguna resistencia a seis clases de antibióticos.

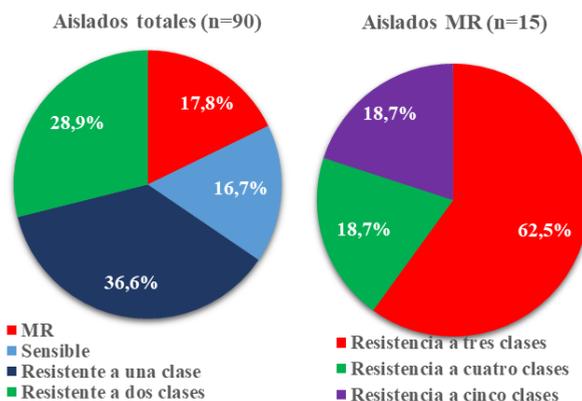


Figura 8. Distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos, de los aislados de *Salmonella* spp.

Los patrones de multiresistencia encontrados en los diferentes aislados se encuentran descritos en la Tabla 10. Como se observa, los patrones que aparecieron en mayor medida fueron AMP/TCY/T y AMP/CHL/TCY, siendo los aislados a partir de preparados cárnicos de ganado los alimentos que mayor tasa de multiresistencia presentan. No se encontraron cepas multiresistentes procedentes de carne o preparados de ave.

Tres de los aislados fueron resistentes, como se ha indicado con anterioridad, a seis de los doce antibióticos estudiados, con patrón AMP/CHL/CIP/NAL/TCY/T. Estas tres cepas procedían de preparados cárnicos de ganado, en concreto de pelota de cerdo. También se encontró una cepa, procedente de carne fresca de ganado, resistente a cinco antibióticos AMP/CHL/CIP/NAL/TCY y, por último, dos de las cepas multiresistentes lo fueron a cuatro antibióticos, encontrándose en los dos casos resistencia a la ampicilina, tetraciclina y trimetoprim, junto al cloranfenicol o al ciprofloxacino, procedentes una de carne fresca de ganado, así como otra de moluscos y pescado (Tabla 10).

Tabla 10. Patrones de multirresistencia en *Salmonella* spp.

Patrón	Origen	n ⁺ /n (%)
AMP/TCY/T	Preparados de ganado	4/90 (4%)
AMP/CHL/TCY	Preparados de ganado	4/90 (4%)
AMP/CIP/TCY	Moluscos y pescado	1/90 (1%)
AMP/CHL/TCY/T	Carne fresca de ganado	1/90 (1%)
AMP/CIP/TCY/T	Moluscos y pescado	1/90 (1%)
AMP/CHL/CIP/NAL/TCY	Carne fresca de ganado	1/90 (1%)
AMP/CHL/CIP/NAL/TCY/T	Preparados de ganado	3/90 (3%)

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
n⁺/n: número de cepas que presentan ese patrón/número de cepas totales de *Salmonella* spp.

4.1.3 Detección de *Salmonella* spp. productora de betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC o carbapenemasas.

Para realizar la selección inicial de las posibles cepas productoras de BLEE, betalactamasas AmpC o carbapenemasas se tuvo en cuenta cuales de las cepas estudiadas fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftazidima, o al meropenem, encontrando que ninguna de las cepas aisladas se ajustaba a estas premisas.

4.2 *Escherichia coli*.

4.2.1 Estudio de la presencia de *E. coli* en agua y alimentos.

Del mismo modo que en el caso de *Salmonella*, las muestras para la detección de la contaminación por *E. coli*, se procesaron en el Laboratorio de Salud Pública, y el aislamiento e identificación de este microorganismo se llevó a

cabo siguiendo los procedimientos internos y acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación según la norma ISO 17025.

Posteriormente, con el fin de ratificar los resultados obtenidos, se confirmó su identificación en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia (Universitat de València) mediante la utilización del sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre®.

El número de muestras analizadas entre enero de 2014 y diciembre de 2015 alcanzó un total de tres mil dieciocho, todas procedentes de productos alimenticios de la provincia de Valencia, y destinadas a la detección de *E. coli* (Tabla 11). Durante el año 2014 se procesaron un total de mil quinientas treinta y tres muestras, presentando setenta y seis de ellas contaminación por *E. coli*, mientras que, en el año 2015, se procesaron un total de mil cuatrocientas ochenta y cinco muestras, siendo positivas treinta y cinco de ellas, lo que supone una positividad del 5% y del 2% respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Presencia de *E. coli* en las muestras obtenidas de diferentes alimentos y aguas en la provincia de Valencia entre enero de 2014 y diciembre de 2015.

Años	n	n+	%
2014	1533	76	5
2015	1485	35	2
Total	3018	111	4

n: número de muestras analizadas; n+: número de muestras positivas en *Salmonella* spp.

La distribución de alimentos de los que procedían las muestras queda reflejada en la Tabla 12. Los alimentos mayoritarios analizados tanto en 2014 como en 2015 fueron las aguas de consumo humano, con alrededor del 70% de las muestras estudiadas cada año. Los preparados de ganado presentaron un

porcentaje ligeramente superior al 19% sobre el total de muestras analizadas por año, y el número de muestras procedentes de otros alimentos fue inferior, sumando entre todas algo más del 10% de las estudiadas cada periodo.

Tabla 12. Tipos de alimentos analizados para el estudio de *E. coli* entre enero de 2014 y diciembre de 2015.

	2014		2015	
	n	%	n	%
Preparados de ave	40	2	54	4
Preparados de ganado	300	20	285	19
Moluscos	54	3	25	2
Frutas y hortalizas	20	1	12	1
Aguas de consumo humano	1035	68	1035	69
Lácteos	84	6	74	5
Total	1533	100	1485	100

n: número de muestras tomadas durante el estudio.

En número y porcentaje de muestras positivas en *E. coli* durante los años estudiados, teniendo en cuenta el tipo de alimento analizado, queda reflejado en la Tabla 13. La presencia de *E. coli* se detectó en el 95% de las frutas y hortalizas frescas analizadas durante el año 2014 y, en el 75% en el año 2015. Además, el 12,5% de las muestras procedentes de preparados de ave en el 2014 fueron positivas para el microorganismo, mientras que, en 2015, no se superó el 2%. La tasa de contaminación en las muestras procedentes de moluscos alcanzó el 25,9% en 2014, sin embargo, en 2015, constituyó el 18,1%. Por otro lado, la presencia de *E. coli* fue menor en el resto de las muestras, destacando la baja prevalencia en aguas de consumo humano (1,8% en 2014 y 0,9% en 2015), en preparados cárnicos de ganado (3,7% y 1,7%), y en productos lácteos (9,5% y 5,4%) (Tabla 13).

Tabla 13. Número y porcentaje de muestras positivas en *E. coli* durante los años estudiados por tipo de alimento.

	2014		2015	
	n+/n	%	n+/n	%
Preparados de ave	5/40	12,5	1/54	1,8
Preparados de ganado	11/300	3,7	5/285	1,7
Moluscos	14/54	25,9	6/33	18,1
Frutas y hortalizas	19/20	95	9/12	75
Aguas de consumo humano	19/1035	1,8	10/1035	0,9
Lácteos	8/84	9,5	4/74	5,4

n+/n, relación entre el número de muestras positivas en *E. coli* y el número de muestras analizadas según tipo de alimento.

4.2.2 Estudio de la resistencia de *E. coli* a los antibióticos.

Una vez aisladas e identificadas las cepas de *E. coli* procedentes de los alimentos y aguas analizados, se procedió a realizar el estudio de las resistencias a los diferentes antibióticos, tal y como se detalla en Material y Métodos, y realizando el estudio agrupando las cepas según el tipo de alimento del que proceden.

El análisis de las resistencias de las distintas cepas de *E. coli* a los antibióticos procedentes de preparados de ave (Tabla 14), indicó que todas las cepas fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos ensayados. La mayoría de las resistencias se asociaron a la tetraciclina (67%), mientras que las resistencias a la ampicilina y ciprofloxacino alcanzaron un 50%. En menor medida aparecieron resistencias al cloranfenicol y ácido nalidíxico, representando un 33%, en ambos casos. Además, todos los microorganismos estudiados fueron sensibles a la colistina, gentamicina, meropenem y tigeciclina.

De las seis cepas de *E. coli* aisladas en este grupo, se encontraron tres cepas multiresistentes, siendo una de ellas resistente a penicilinas, anfenicoles y tetraciclinas mientras que las otras dos cepas fueron resistentes penicilinas,

cefalosporinas, anfenicoles, quinolonas, tetraciclinas y pirimidinas. Con respecto al IM, fue superior a 0,20 en tres aislados, mientras que el resto no se alcanzó ese valor (Tabla 14).

Tabla 14. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de preparados de ave.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
2	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,41	+
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
20	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	0,41	+
21	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
22	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	0,25	+
R	3	1	1	2	3	0	0	0	2	4	0	1		3
% R	50	17	17	33	50	-	-	-	33	67	-	17	-	50

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
 % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

En cuanto a las cepas de *E. coli* aisladas de preparados de ganado (Tabla 15), dos de las cepas presentaron resistencia a cinco de los doce de los antibióticos ensayados, y tan solo seis de las cepas de *E. coli* fueron sensibles a todos los antibióticos. Los mayores porcentajes de resistencias se presentaron a la tetraciclina (63%) y a la ampicilina (56%), seguidas en menor medida por las quinolonas, que superaron el 30%. De las dieciséis cepas de *E. coli* aisladas de este grupo, nueve de las cepas fueron multirresistentes. Además, tres cepas aisladas de los preparados de ganado fueron resistentes a seis antimicrobianos pertenecientes al grupo de penicilinas, anfenicoles, quinolonas, tetraciclinas y pirimidinas y, otras tres a cinco antibióticos pertenecientes al grupo de penicilinas, quinolonas, tetraciclinas y pirimidinas. El IM de nueve de las cepas estudiadas superó el 0,20 (Tabla 15).

Tabla 15. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de preparados de ganado.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
15	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	0,5	+
16	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	0,41	+
17	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	0,33	+
23	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	0,25	+
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
37	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	0,33	+
81	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
95	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	0,5	+
96	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	0,41	+
97	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,16	-
98	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	0,5	+
99	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	0,5	+
R	9	1	1	4	6	0	0	0	5	10	3	7	-	9
% R	56	6	6	25	38	-	-	-	31	63	19	44	-	56

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
 % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

En relación con los microorganismos procedentes de moluscos (Tabla 16), de las veinte cepas estudiadas en este grupo, ocho fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados. Por otra parte, dos de los aislados presentaron resistencia a seis de los antibióticos, otras dos cepas a ocho y, por último, dos a nueve antibióticos. El resto de los microorganismos fue resistente al menos a un antimicrobiano, principalmente al ciprofloxacino (50%) seguido de la ampicilina y el trimetoprim (35% en ambos casos). El porcentaje de cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftazidima, y al ácido nalidíxico alcanzó un 30%, mientras que se llegó al 25% en el caso de la tetraciclina y la tigeciclina, al 20% en el cloranfenicol y a un 10% cuando se estudió la colistina y la gentamicina. (Tabla 16).

Tabla 16. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de moluscos.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
4	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	0,33	+
5	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	0,5	+
28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
33	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	0,66	+
35	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	0,41	+
36	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	0,66	+
41	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	0,75	+
43	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
44	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
46	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
59	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
77	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
78	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	0,75	+
85	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
86	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
87	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,16	-
100	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
102	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
104	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	0,5	+
R	7	6	6	4	10	2	2	0	6	5	5	7	-	8
% R	35	30	30	20	50	10	10	-	30	25	25	35	-	40

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
% R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

El IM, y de acuerdo con los resultados anteriores, fue muy elevado en algunos casos (0,75, 0,66, 0,50, 0,41, 0,33 y 0,25) y ocho cepas presentaron multiresistencia.

Como se observa en la Tabla 17, doce de las veintiocho cepas de *E. coli* procedentes de frutas y hortalizas, presentaron resistencia a algún antibiótico, siendo el resto sensibles a todos los ensayados.

Los microorganismos, mayoritariamente mostraron resistencia al ciprofloxacino (25%), seguido de la ampicilina (14%) y, en menor medida, a la tetraciclina y trimetoprim, con un 11% en ambos casos. No se encontraron resistencias para la ceftazidima, colistina, gentamicina, meropenem y tigeciclina.

Tabla 17. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de frutas y hortalizas.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
9	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	0,16	-
10	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
11	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
25	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	0,41	+
26	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	0,25	+
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
31	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	0,16	-
32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
34	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
38	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
39	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
40	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
45	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,08	-
101	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
103	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
105	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
106	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
107	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
108	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
109	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
110	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
111	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
R	4	0	0	2	7	0	0	0	1	3	0	3	0,06	2
% R	14	-	-	7	25	-	-	-	4	11	-	11	-	7

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
 % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

En relación con los microorganismos procedentes de aguas de consumo humano (Tabla 18) sólo se encontraron dos cepas multirresistentes, siendo una de ellas resistente a cinco de los antibióticos estudiados pertenecientes al grupo de las penicilinas, anfenicoles, quinolonas, tetraciclinas y pirimidinas. Sólo dos aislados superaron un IM de 0,20.

Tabla 18. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de aguas de consumo humano.

Nº de cepa	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
1	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	0,41	+
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
55	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	0,25	+
56	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
57	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
58	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
61	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
62	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
63	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
64	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	0,25	+
65	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
66	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
67	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	0,41	+
72	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
73	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
74	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	0,33	+
75	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,25	+
76	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
79	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	0,41	+
80	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
84	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
88	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
89	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
90	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
91	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
92	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
93	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
94	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
R	7	2	0	0	12	1	0	0	1	7	2	4	-	7
% R	24	7	-	-	41	3	-	-	3	24	7	14	-	24

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
 % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

El último grupo de cepas de *E. coli* analizadas, fueron las procedentes de productos lácteos (Tabla 19). La mayoría de las resistencias se encontraron frente al ciprofloxacino y a la tetraciclina, alcanzando un 25% en cada caso, seguido de las cefalosporinas (cefotaxima y ceftazidima), colistina y ácido nalidíxico con un 17% en todos los casos. En una sola ocasión se encontró resistencia a la ampicilina (8%). Por otro lado, no encontramos resistencias al cloranfenicol, al meropenem, ni a la tigeciclina.

Tabla 19. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos.

Nº de cepas	AMP	CTX	CAZ	CHL	CIP	COL	GEN	MEM	NAL	TCY	TIG	T	IM	MR
49	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
50	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
52	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
53	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
54	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
68	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,08	-
69	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
70	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,25	+
71	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
82	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	0,75	+
83	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	0,75	+
R	1	2	2	0	3	2	2	2	2	3	0	3	-	3
% R	8	17	17	-	25	17	17	17	17	25	-	25	-	25

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim

% R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

Como se observa en la Tabla 19, respecto a un total de doce cepas aisladas en este grupo, tres de las cepas analizadas fueron multiresistentes, presentando dos de ellas resistencia a nueve de los doce antibióticos estudiados perteneciente a los grupos de cefalosporinas, quinolonas, polimixinas, aminoglucósidos, carbapenemas, tetraciclinas y pirimidinas, con un índice de multiresistencia muy alto (0,75), mientras que otra tan solo lo hizo a tres antimicrobianos perteneciente a las penicilinas, tetraciclinas y pirimidina (IM de 0,25).

En general, las diferentes cepas de *E. coli* aisladas fueron resistentes al ciprofloxacino (37%), a la tetraciclina (29%), a la ampicilina (28%). Por otra parte, prácticamente casi todas las cepas fueron sensibles a la gentamicina y a la colistina y todas sensibles al meropenem (Figura 9).

El porcentaje de resistencias a cada antibiótico, teniendo en cuenta el origen de la muestra, se encuentra en la Tabla 20. Destaca la resistencia muy alta a la

tetraciclina detectada en los aislados a partir de preparados de ave (66,6%) y a la ampicilina y al ciprofloxacino (50% en ambos casos).

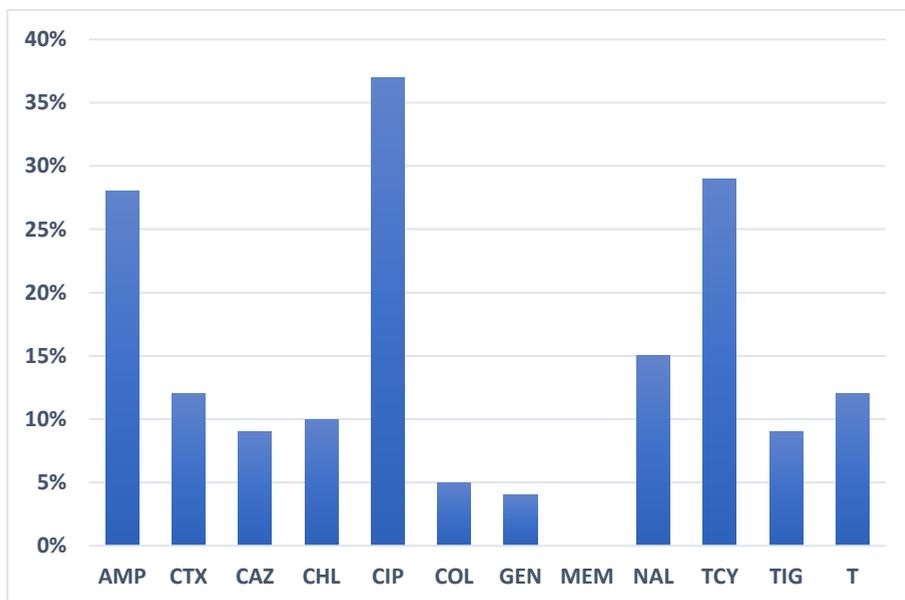


Figura 9. Resistencia de *E. coli* a los antibióticos ensayados.

En las cepas procedentes de preparados de ganado las resistencias que aparecen en mayor medida son a la tetraciclina (62,5%), a la ampicilina (55,5%) y al trimetoprim (43,7%), mientras que las cepas obtenidas de moluscos presentan resistencia muy alta al ciprofloxacino (50%) (Tabla 20). El valor-p en el caso de la ampicilina, el ciprofloxacino, la ceftazidima, el cloranfenicol, el ácido nalidíxico, la colistina, la tetraciclina y la tigeciclina, fue inferior a 0,05, lo que indicó diferencias significativas en relación con el origen de la muestra y estos antibióticos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el caso del resto de antimicrobianos estudiados ($p > 0,05$).

Tabla 20. Resistencia a antimicrobianos de *E. coli*. según el origen de la muestra.

	Preparados de ave	Preparados de ganado	Moluscos	Frutas y hortalizas	Aguas consumo humano	Lácteos	Valor-P
	n+/n (%)						
AMP	3/6 (50)	9/16 (55,5)	7/20 (35)	4/28 (14,3)	7/29 (24,1)	1/12 (8,3)	0,020
CTX	1/6 (16,6)	1/16 (6,2)	6/20 (30)	1/28 (3,6)	2/29 (6,9)	2/12 (16,6)	0,115
CAZ	1/6 (16,6)	1/16 (6,2)	6/20 (30)	0/28 (0)	0/29 (0)	2/12 (16,6)	0,002
CHL	2/6 (33,3)	4/16 (25)	4/20 (20)	2/28 (7,1)	0/29 (0)	0/12 (0)	0,007
CIP	3/6 (50)	6/16 (37,5)	10/20 (50)	7/28 (25)	12/29 (41,4)	3/12 (25)	0,457
COL	0/6 (0)	0/16 (0)	2/20 (10)	0/28 (0)	1/29 (3,4)	2/12 (16,6)	0,143
GEN	0/6 (0)	0/16 (0)	2/20 (10)	0/28 (0)	0/29 (0)	2/12 (16,6)	0,059
MEM	0/6 (0)	0/16 (0)	0/20 (0)	0/28 (0)	0/29 (0)	2/12 (16,6)	0,101
NAL	2/6 (33,3)	5/16 (31,2)	6/20 (30)	1/28 (3,6)	1/29 (3,4)	2/12 (16,6)	0,011
TCY	4/6 (66,6)	10/16 (62,5)	5/20 (25)	3/28 (10,7)	7/29 (24,1)	3/12 (25)	0,004
TIG	0/6 (0)	3/16 (18,7)	5/20 (25)	0/28 (0)	2/29 (6,9)	0/12 (0)	0,012
T	1/6 (16,6)	7/16 (43,7)	7/20 (35)	3/28 (10,7)	4/29 (13,8)	3/12 (25)	0,096

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim
n: total de aislados; n⁺: total de aislados resistentes

También se examinó el número de resistencias que presentaron las diferentes cepas de *E. coli* según el tipo de la muestra estudiada (Tabla 21). De las ciento once cepas de *E. coli* aisladas, cincuenta y dos fueron sensibles a todos los antibióticos, es decir, el 46% de las cepas totales. De estas cincuenta y dos

cepas, quince procedían de frutas y hortalizas y otras quince de aguas de consumo humano. Ocho tenían su origen en moluscos, así como en lácteos. Por último, seis venían de productos de ganado. No se encontraron cepas procedentes de preparados cárnicos de aves sensibles a todos los antibióticos. Diecisiete cepas fueron resistentes a un solo antibiótico, seis provenían de frutas y hortalizas y otras seis de aguas de consumo humano, mientras que dos derivaban de preparados de ave, lo mismo que de moluscos. No se encontraron cepas, procedentes de preparados de ganado, resistentes a un solo antibiótico (Tabla 21).

Tabla 21. Número de resistencias de las cepas de *E. coli* a los antibióticos en relación con su origen.

Nº de resistencias	Preparados de ave	Preparados de ganado	Moluscos	Frutas y hortalizas	Lácteos	Agua	Total
0	0	6	8	15	8	15	52
1	2	0	2	6	1	6	17
2	1	0	1	4	0	1	7
3	1	2	1	2	1	2	9
4	0	2	1	0	0	1	4
5	2	3	1	1	0	3	10
6	0	3	2	0	0	0	5
8	0	0	2	0	0	0	2
9	0	0	2	0	2	0	4

En la Figura 10, se muestra la distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos antibióticos. De *E. coli*, un 46,8% de las cepas de *E. coli* fueron sensibles a todos los antibióticos mientras que, el

27,9% de los aislados presentaron resistencia a al menos tres clases de antibióticos, un 19,8% a una sola familia y tan solo un 5,4% fue resistente a dos clases distintas. De las treinta y una cepas multirresistentes, el 29% fueron resistentes a tres clases de antibióticos, el 35,5% a cuatro clases, el 19,3% a cinco y la resistencia a seis y siete familias diferentes la alcanzo un 6,4% y 9,7% de los microorganismos estudiados en ambos casos.

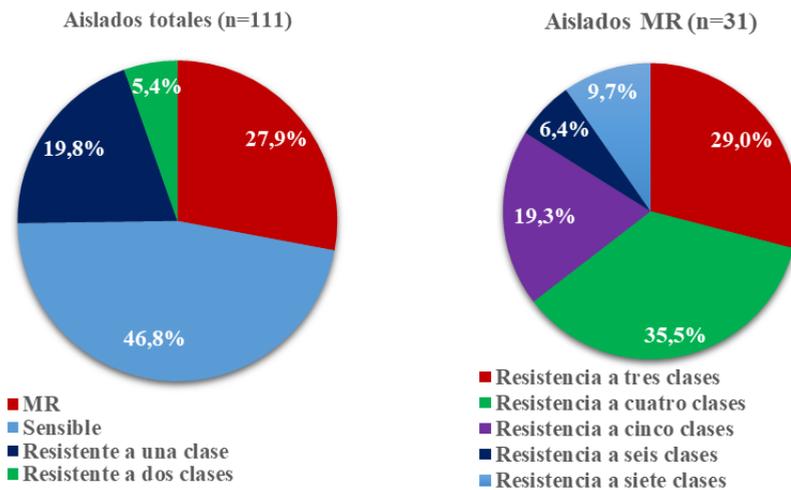


Figura 10. Distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos, de los aislados de *E. coli*.

Los aislados multirresistentes presentaron veinticinco patrones diferentes, lo que implica que tan solo en unos pocos casos el patrón se repetía (Tabla 22). Hay que destacar que la ampicilina forma parte de veinte de esos patrones y la tetraciclina de diecinueve. Además, cuatro de los aislados presentan resistencia a nueve de los antimicrobianos ensayados, procediendo dos de ellas de productos lácteos y las otras dos han sido aisladas a partir de moluscos.

Tabla 22. Patrones de multirresistencia antibiótica en *E. coli*.

	Origen	n°/n (%)
AMP/CTX/CIP	Agua	1/111 (1%)
AMP/CHL/TCY	Preparados de aves Frutas y hortalizas	2/111 (2%)
AMP/TCY/T	Productos lácteos	1/111 (1%)
CIP/COL/TCY	Agua	1/111 (1%)
CIP/TCY/T	Agua	1/111 (1%)
AMP/CIP/TCY/TIG	Preparados de ganado	1/111 (1%)
AMP/CHL/TCY/T	Preparados de ganado	1/111 (1%)
AMP/CIP/NAL/T	Moluscos	1/111 (1%)
AMP/CIP/TCY/T	Agua	1/111 (1%)
AMP/CTX/CAZ/CIP/NAL	Preparados de ave	1/111 (1%)
AMP/CTX/CIP/TCY/TIG	Agua	1/111 (1%)
AMP/CHL/CIP/TCY/T	Preparados de ave Frutas y hortalizas	2/111 (2%)
AMP/CHL/TCY/TIG/T	Preparados de ganado	1/111 (1%)
AMP/CIP/NAL/TCY/T	Agua	1/111 (1%)
AMP/CIP/NAL/TCY/T	Preparados de ganado	2/111 (2%)
AMP/CIP/TCY/TIG/T	Agua	1/111 (1%)
CTX/CAZ/CIP/TIG/T	Moluscos	1/111 (1%)
AMP/CTX/CAZ/CHL/CIP/NAL	Moluscos	1/111 (1%)
AMP/CTX/ CAZ/CIP/NAL/TCY	Preparados de ganado	1/111 (1%)
AMP/CHL/CIP/NAL/TCY/T	Preparados de ganado Moluscos	3/111 (3%)
AMP/CTX/CAZ/CHL/CIP/COL/TIG/T	Moluscos	1/111 (1%)
CTX/CAZ/CIP/COL/GEN/NAL/TCY/TIG	Moluscos	1/111 (1%)
AMP/CTX/CAZ/CHL/CIP/NAL/TCY/TIG/T	Moluscos	1/111 (1%)
AMP/CTX/CAZ/CIP/GEN/NAL/TCY/TIG/T	Moluscos	1/111 (1%)
CTX/CAZ/CIP/COL/GEN/MEM/NAL/TCY/T	Productos lácteos	2/111 (2%)

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim; n+/n, relación entre el número de muestras positivas para ese patrón. Y el número de muestras analizadas.

4.2.3 Detección de *E. coli* productora de betalactamasas de espectro ampliado (BLEE).

Para realizar la selección inicial de las posibles cepas productoras de BLEE, se tuvo en cuenta cuales de las cepas estudiadas fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftazidima, encontrándose trece cepas que se ajustaban a estas premisas, diez de las cuales habían presentado resistencia a los dos antibióticos y tres eran resistente únicamente a cefotaxima (Tabla 23).

Tabla 23. Cepas de *E. coli* posibles productoras de betalactamasas de espectro extendido.

Cepas	Origen	Resistencia antibiótica
2	Preparados cárnicos ave	AMP, CTX, CAZ, CIP, NAL
98	Preparados cárnicos ganado	AMP, CTX, CAZ, CIP, NAL, TCY
5	Moluscos	AMP, CTX, CAZ, CHL, CIP, NAL
33	Moluscos	CTX, CAZ, CIP, COL, GEN, NAL, TCY, TIG
36	Moluscos	AMP, CTX, CAZ, CHL, CIP, COL, TIG, T
41	Moluscos	AMP, CTX, CAZ, CIP, GEN, NAL, TCY, TIG, T
78	Moluscos	AMP, CTX, CAZ, CHL, CIP, NAL, TCY, TIG, T
35	Moluscos	CTX, CAZ, CIP, TIG, T
82	Lácteos	CTX, CAZ, CIP, COL, GEN, MEM, NAL, TCY, T
83	Lácteos	CTX, CAZ, CIP, COL, GEN, MEM, NAL, TCY, T
75	Agua	AMP, CTX, CIP
79	Agua	AMP, CTX, CIP, TCY, TIG
31	Frutas y hortalizas	CTX, CIP, T

AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; T: trimetoprim

Una vez identificadas las cepas como posibles productoras de BLEE, el NCCLS recomienda realizar pruebas confirmatorias que permitan corroborar la producción de estas enzimas por parte de la cepa estudiada. Para ello se utilizaron tres métodos: la prueba de sinergia de doble disco, el método de discos combinados con inhibidor y el método de E-test.

4.2.3.1 Sinergia de doble disco.

Se estudió la presencia de *E. coli* productor de BLEE en las trece cepas relacionadas en la tabla 23 con la técnica de sinergia de doble disco descrita en Material y Métodos.

Los aislados que presentaron un ensanchamiento o ampliación en la zona de inhibición comprendida entre los halos de inhibición en alguno de los antimicrobianos y el disco con el inhibidor de betalactamasas se consideraron positivos para la presencia de BLEE.

Se observó la posible presencia de BLEE en las cepas 2, 36, 41, 78 y 98, no apreciándose en el resto de los microorganismos estudiados.

4.2.3.2 Discos combinados con inhibidor.

Se analizaron las muestras de *E. coli* siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos, utilizando discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico.

La interpretación de los resultados se basa en la medición del halo de inhibición producido por la ceftazidima, cefotaxima o cefepima en presencia de ácido clavulánico, considerándose positivo cuando se produce un incremento mayor o igual a cinco mm respecto al de la cefalosporina

correspondiente sin ácido clavulánico. Las medidas de los halos de inhibición indicaron que cinco de las cepas estudiadas presentaban BLEE (2, 98 41, 78 y 82) (Tabla 24).

Tabla 24. Medida en mm de los halos de inhibición utilizando discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico en *E. coli*.

Cepas	CTL	CTX	CAL	CAZ	FEL	FEP
2	30	29	26	21	29	30
98	46	21	40	12	41	33
5	43	45	33	38	35	45
33	30	40	27	35	30	41
36	32	32	27	25	30	35
41	35	30	27	21	30	33
78	35	30	30	25	28	30
35	27	24	22	19	23	26
82	40	34	35	25	38	35
83	30	30	26	24	27	30
75	34	30	25	24	30	30
79	35	33	25	24	32	35
31	32	31	29	25	30	33

CTL: Cefotaxima-clavulánico; CTX: Cefotaxima;
 CAL: Cef tazidima-clavulánico; CAZ: Cef tazidima;
 FEL: Cefepime-clavulánico; FEP: Cefepime

4.2.3.3 E-test.

Siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos, al utilizar el método de E-test, la CIM estuvo determinada por el punto donde la elipse de inhibición del crecimiento intercepta de la tira. Para confirmar la producción de BLEE, se obtuvo el resultado de dividir la CIM del antimicrobiano solo entre la CIM del antimicrobiano combinado con el ácido clavulánico; si esta razón es mayor o igual a ocho se confirma la producción de BLEE. La presencia de una zona fantasma o la deformación de la elipse de inhibición también se considera positivo, independientemente de la ratio de CMI. La Tabla 25 muestra los resultados obtenidos, confirmando la existencia de

BLEE en nueve de las cepas estudiadas. Las cepas en las que esta ratio fue igual o mayor a ocho fueron la 2, 33, 36, 41, 75, 78, 82, 83 y 98.

Tabla 25. Relación entre la CIM del antimicrobiano solo y la CIM del antimicrobiano combinado con el ácido clavulánico en *E. coli* obtenidos mediante la técnica de E-test.

Nº de cepa	Ratio		
	CTX/CTL	CAZ/CAL	FEP/FEL
2	0,25/0,016=15,6	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
98	*	*	*
5	0,25/0,047=5,3	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
33	0,25/0,016=15,6	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
36	0,25/0,016=15,6	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
41	0,25/0,023=10,9	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
78	0,25/0,016=15,6	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
35	0,25/0,047=5,3	0,5/0,064=7,8	0,25/0,094=3,9
82	0,25/0,016=15,6	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
83	0,25/0,023=10,9	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
75	0,25/0,016=15,6	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
79	0,25/0,047=5,3	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9
31	0,25/0,032=7,8	0,5/0,064=7,8	0,25/0,064=3,9

CAZ/CAL: ceftacídine/ceftacídine + ácido clavulánico

CTX/CTL: cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulánico

FEP/FEL: cefepime/cefepime + ácido clavulánico

(*) Deformación de la elipse de inhibición

Teniendo en cuenta métodos utilizados en la detección de BLEE de las cepas de *E. coli*, la Tabla 26 muestra un resumen de los resultados obtenidos. Sólo las cepas 2, 41 y 78 arrojan un resultado positivo en los tres métodos de detección.

Tabla 26. Resumen de cepas de *E. coli* que presentan BLEE teniendo en cuenta los tres métodos utilizados para su detección.

Cepas	Sinergia de doble disco	Discos combinados con inhibidor	E-test
2	+	+	+
5	-	-	-
31	-	-	-
33	-	-	+
35	-	-	-
236	+	-	+
41	+	+	+
75	-	-	+
78	+	+	+
79	+	-	-
82	-	+	+
83	-	-	+
98	-	+	+

+: positivo a BLEE; -: negativo a BLEE

4.2.4 Detección de *E. coli* productora de betalactamasas tipo AmpC.

La selección inicial de las cepas posibles productoras de estas enzimas se realizó del mismo modo que para las BLEE, teniendo en cuenta cuales fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (Tabla 27). La determinación de los aislados positivos se realizó mediante la técnica de discos combinados con inhibidor. Consiste en comparar los halos de inhibición de un disco con alguna cefalosporina de tercera generación con el de un disco con la misma cefalosporina más cloxacilina.

La potenciación de la actividad de la cefalosporina en presencia del inhibidor, indica la producción de AmpC cuando el incremento del diámetro de inhibición sea igual o superior a cinco mm. Los resultados, como puede observarse en la Tabla 27, indican que ninguna de las cepas de *E. coli* analizadas es productora de betalactamasas tipo AmpC.

Tabla 27. Medida en mm de los halos de inhibición obtenidos mediante la técnica de los discos combinados con inhibidor, para detectar la presencia de cepas productoras de betalactamasas tipo AmpC.

Nº de cepa	CTC	CTX	CAC	CAZ
2	39	37	33	30
98	35	30	23	20
5	50	50	39	38
33	37	36	30	31
36	42	40	35	35
41	45	45	40	40
78	40	40	30	30
35	37	35	32	30
82	37	36	30	30
83	40	38	28	28
75	40	40	33	34
79	48	45	46	42
31	40	40	37	35

CTC: cefotaxima + cloxacilina; CTX: cefotaxima;
CAC: ceftazidima + cloxacilina; CAZ: ceftazidima

4.3 *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

4.3.1 Estudio de la presencia de *C. jejuni* y *C. coli*.

De acuerdo con el protocolo de aislamiento e identificación de microorganismos del género *Campylobacter* descrito en Material y Métodos, durante el periodo comprendido entre enero de 2016 y diciembre de 2017 se realizaron controles sobre un total de cuatrocientas ochenta y tres muestras provenientes de aves de la provincia de Valencia, destinadas a la detección de este género de microorganismos. Las muestras, como en los casos anteriores, se procesaron en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia y posteriormente los resultados fueron confirmados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia mediante la utilización del sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre®.

En el año 2016 las muestras analizadas fueron trescientas cincuenta y dos, de las cuales trescientas doce procedían de matadero y cuarenta de punto de venta. En el año 2017 se analizaron ciento treinta y una muestras, ciento dieciocho de matadero y trece de punto de venta. (Tabla 28). En un 19,8% de las muestras del año 2016 se encontró la presencia de *Campylobacter* spp., mientras que este porcentaje se elevó hasta el 41,9% en el año 2017. Según su origen, en 2016, el mayor porcentaje de muestras positivas corresponde a punto de venta (57,5%), mientras que en 2017 fue mayor el porcentaje de muestras positivas procedentes de matadero (43,2%).

Tabla 28. Muestras positivas en *Campylobacter* spp. durante los años estudiados por tipo de alimento.

	2016		2017	
	n+/n	%	n+/n	%
Matadero (Canal y piel de cuello)	47/312	15,1	51/118	43,2
Punto de venta (Embalaje y pollo de engorde)	23/40	57,5	4/13	30,8
Total	70/352	19,8	55/131	41,9

n+/n, relación entre el número de muestras positivas en *Campylobacter* spp. y el número de muestras analizadas según tipo de alimento.

Como se observa en la Tabla 29, la especie de las bacterias aisladas correspondió mayoritariamente a *C. jejuni*, 84,2% de las muestras en 2016 y 78,1% en 2017, ocurriendo lo mismo si tenemos en cuenta el origen de la muestra (matadero o punto de venta).

Tabla 29. Número de muestras positivas en *C. coli* y *C. jejuni* por año y alimento.

	2016			2017		
	n	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	n	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>
Matadero (Canal y piel de cuello)	47	4 (8,5%)	43 (91,4%)	51	12 (23,5%)	39 (76,4%)
Punto de venta (Embalaje y pollo de engorde)	23	7 (30,4%)	16 (69,5%)	4	0	4 (100%)
Total	70	11 (15,7%)	59 (84,2)	55	12 (21,8%)	43 (78,1%)

n: número de cepas de *Campylobacter* spp. encontradas en los diferentes alimentos.

4.3.2 Estudio de la resistencia de *C. jejuni* y *C. coli* a antibióticos.

Posteriormente, una vez aislados los microorganismos, se procedió a realizar el estudio de las resistencias a los diferentes antibióticos marcados por la legislación, realizando el estudio agrupando las cepas según el tipo de alimento del que procedían. Como se puede observar en la Tabla 30, los microorganismos procedentes de canal de pollo fueron, en un 98% resistentes simultáneamente al ciprofloxacino y ácido nalidíxico (quinolonas), mientras que el 81% presentó resistencia a la tetraciclina. Además, estas cepas resistentes a la tetraciclina, también lo fueron a las dos quinolonas. Tan solo se encontraron un 12% de cepas resistentes a la estreptomina y un 2% a la eritromicina y a la gentamicina.

Para un total de cuarenta y ocho cepas aisladas en este grupo, se encontraron siete cepas multirresistentes de las cuales, seis de las cepas (una de *C. coli* y cinco de *C. jejuni*) presentaron resistencia a cuatro de los antibióticos ensayados perteneciente a los grupos de los macrólidos, quinolonas y tetraciclinas (Tabla 30).

Tabla 30. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *C. coli* y *C. jejuni* aisladas de canal de pollo.

	ERI	CIP	GEN	NAL	STR	TCY	IM	MR
<i>C. coli</i>								
1	S	R	S	R	S	S	0,33	-
67	S	R	S	R	S	R	0,5	-
68	R	R	S	R	S	R	0,66	+
78	S	R	S	R	R	R	0,66	+
93	S	R	S	R	S	R	0,5	-
<i>C. jejuni</i>								
2	S	R	S	R	S	R	0,5	-
3	S	R	S	R	S	S	0,33	-
61	S	R	S	R	S	R	0,5	-
65	S	R	S	R	S	R	0,5	-
63	S	R	S	R	S	S	0,33	-
69	S	R	S	R	S	R	0,5	-
70	S	R	S	R	S	R	0,5	-
73	S	R	S	R	S	R	0,5	-
74	S	R	S	R	S	R	0,5	-
75	S	R	S	R	S	R	0,5	-
76	S	R	S	R	S	R	0,5	-
77	S	R	S	R	R	R	0,66	+
79	S	R	S	R	S	R	0,5	-
80	S	R	S	R	S	R	0,5	-
83	S	R	S	R	S	R	0,5	-
86	S	R	S	R	S	S	0,33	-
87	S	R	S	R	S	S	0,33	-
91	S	R	S	R	S	S	0,33	-
92	S	R	S	R	S	R	0,5	-
94	S	R	R	R	R	R	0,83	+
95	S	R	S	R	S	R	0,5	-
97	S	R	S	R	S	R	0,5	-
99	S	R	S	R	S	R	0,5	-
100	S	R	S	R	S	R	0,5	-
106	S	R	S	R	S	R	0,5	-
108	S	R	S	R	S	R	0,5	-
109	S	R	S	R	R	R	0,66	+
110	S	R	S	R	S	R	0,5	-
111	S	R	S	R	S	R	0,5	-
112	S	R	S	R	S	R	0,5	-
113	S	R	S	R	R	R	0,66	+
114	S	R	S	R	S	R	0,5	-
115	S	R	S	R	S	R	0,5	-
116	S	R	S	R	S	R	0,5	-
117	S	R	S	R	S	R	0,5	-
118	S	R	S	R	S	R	0,5	-
119	S	R	S	R	S	S	0,33	-
120	S	R	S	R	S	R	0,5	-
121	S	R	S	R	R	R	0,66	+
122	S	R	S	R	S	R	0,5	-
123	S	S	S	S	S	S	-	-
124	S	R	S	R	S	S	0,33	-
125	S	R	S	R	S	R	0,5	-
R	1	47	1	47	6	39	-	7
% R	2	98	2	98	12	81	-	15

ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; STR: estreptomina; TCY: tetraciclina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

Tabla 31. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *C. coli* y *C. jejuni* aisladas de piel de cuello.

	ERI	CIP	GEN	NAL	STR	TCY	IM	MR
<i>C. coli</i>								
7	S	S	S	S	S	R	0,16	-
8	S	S	S	S	S	R	0,16	-
22	S	R	S	R	S	R	0,5	-
24	S	S	S	S	S	S	-	-
25	S	R	S	R	S	R	0,5	-
26	S	R	S	R	S	R	0,5	-
31	S	R	S	R	R	R	0,66	+
39	S	R	S	R	R	R	0,66	+
40	S	R	S	R	R	R	0,66	+
43	S	R	S	R	S	R	0,5	-
51	R	R	R	R	R	R	1,0	+
<i>C. jejuni</i>								
4	S	R	S	R	S	S	0,33	-
5	S	R	S	R	S	S	0,33	-
6	S	R	S	R	S	S	0,33	-
9	S	R	S	R	S	R	0,5	-
10	S	R	S	R	S	S	0,33	-
11	S	R	S	R	S	S	0,33	-
12	S	R	S	R	R	R	0,66	+
13	S	R	S	R	S	R	0,5	-
14	S	R	S	R	S	R	0,5	-
17	S	R	S	R	S	R	0,5	-
18	S	R	S	R	S	S	0,33	-
19	S	R	S	R	S	R	0,5	-
20	S	R	S	R	S	R	0,5	-
21	S	R	S	R	S	R	0,5	-
23	S	R	S	R	S	R	0,5	-
27	S	R	S	R	S	R	0,5	-
28	S	R	S	R	S	R	0,5	-
29	S	R	S	R	S	R	0,5	-
30	S	R	R	R	S	R	0,66	+
32	S	R	S	R	S	S	0,33	-
33	S	R	S	R	S	R	0,5	-
34	S	R	S	R	S	R	0,5	-
37	S	R	S	R	S	R	0,5	-
38	S	R	S	R	S	R	0,5	-
41	S	R	S	R	S	R	0,5	-
42	S	R	S	R	S	R	0,5	-
44	S	R	S	R	S	R	0,5	-
45	S	S	S	S	R	R	0,33	-
46	S	R	S	R	S	R	0,5	-
47	S	S	S	S	S	R	0,5	-
48	S	R	S	R	S	R	0,5	-
49	S	R	S	R	S	R	0,5	-
50	S	R	S	R	S	R	0,5	-
52	S	R	S	R	S	R	0,5	-
53	S	R	S	R	S	R	0,5	-
54	S	R	S	R	S	S	0,33	-
55	S	R	S	R	S	R	0,5	-
56	S	R	S	R	S	R	0,5	-
57	R	R	R	R	R	R	1,0	+
R	2	45	3	45	7	41	-	7
% R	4	90	6	90	14	82	-	14

ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; STR: estreptomina; TCY: tetraciclina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

Otra de las cepas de *C. jejuni* presentó resistencia a cinco de los seis antibióticos estudiados perteneciente a todas las clases de antibióticos excepto los macrólidos (Tabla 30).

De acuerdo con estos datos, el IM supero en la mayoría de los casos el valor 0,20. Sin embargo, a pesar de estos valores de IM, sólo dos cepas de *C. coli* y cinco de *C. jejuni* presentan multiresistencia (Tabla 30).

De las cincuenta cepas aisladas de piel de cuello (Tabla 31), la mayoría fueron resistentes de forma simultánea a las dos quinolonas (90%), y en menor medida a la tetraciclina (82%). Se encontraron porcentajes inferiores de resistencias para el resto de los antibióticos ensayados. En las muestras de *C. coli*, el IM supero en la mayoría de los casos el valor de referencia 0,20, sin embargo, sólo tres de las muestras de *C. jejuni* estudiadas superaron ese valor. Cuatro cepas de *C. coli* y tres de *C. jejuni* presentaron multiresistencia, siendo importante resaltar que dos aislados mostraron resistencia a todos los antimicrobianos ensayados (Tabla 31).

Tabla 32. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *C. coli* y *C. jejuni* aisladas del embalaje de pollo.

	ERI	CIP	GEN	NAL	STR	TCY	IM	MR
<i>C. coli</i>								
58	S	R	S	R	S	R	0,5	-
<i>C. jejuni</i>								
15	S	R	S	R	S	R	0,5	-
16	S	R	S	R	S	R	0,5	-
81	S	R	S	R	S	R	0,5	-
R	0	4	0	4	0	4	-	-
% R	-	100	-	100	-	100	-	-

ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; STR: estreptomina; TCY: tetraciclina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

En relación con las muestras procedentes del embalaje de pollo (Tabla 32), las cuatro cepas fueron resistentes al grupo de las quinolonas y a la tetraciclina de forma simultánea. No se encontró ninguna resistencia para la eritromicina,

gentamicina y estreptomina, y no se detectó ninguna multiresistencia, aunque el IM en todos los casos fue de 0,50.

Por último, en el estudio de las muestras de pollo de engorde (Tabla 33), de las veintitrés cepas aisladas en este grupo, la mayoría de las cepas de *Campylobacter* spp. fueron resistentes paralelamente a las dos quinolonas (96%), y en menor medida al grupo de las tetraciclinas (70%).

Tabla 33. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *C. coli* y *C. jejuni* aisladas de pollo de engorde.

	ERI	CIP	GEN	NAL	STR	TCY	IM	MR
<i>C. coli</i>								
60	R	R	R	R	R	R	1,0	+
63	S	R	S	R	S	S	0,33	-
64	S	R	S	R	S	R	0,5	-
89	S	R	S	R	S	S	0,33	-
90	S	R	S	R	S	S	0,33	-
103	S	R	S	R	S	R	0,5	-
<i>C. jejuni</i>								
35	S	R	S	R	S	R	0,5	-
36	S	R	S	R	S	R	0,5	-
59	S	R	S	R	S	R	0,5	-
62	S	R	S	R	S	R	0,5	-
71	S	R	S	R	S	R	0,5	-
72	S	R	S	R	S	S	0,33	-
82	S	R	S	R	S	R	0,5	-
84	S	R	S	R	S	S	0,33	-
85	S	R	S	R	S	R	0,5	-
88	S	S	S	S	S	S	-	-
96	S	R	S	R	R	R	0,66	+
98	S	R	S	R	S	R	0,5	-
101	S	R	S	R	S	R	0,5	-
102	S	R	S	R	S	R	0,5	-
104	S	R	S	R	S	S	0,5	-
105	S	R	S	R	S	R	0,5	-
107	S	R	S	R	S	R	0,5	-
R	1	22	1	22	2	16	-	2
% R	4	96	4	96	9	70	-	8,7

ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidixico; STR: estreptomina; TCY: tetraciclina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

Una cepa (*C. coli*) presentó resistencia a todos los antibióticos analizados, perteneciente a todas las clases de antibióticos estudiados (macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos y tetraciclinas) otra a cuatro antimicrobianos (*C. jejuni*) y dieciséis de ellas (70%) fueron resistentes al mismo tiempo a las

quinolonas y a la tetraciclina, siendo solo dos cepas multirresistentes. Con respecto a los IM, y de acuerdo con los resultados anteriores, fue 1,0 y 0,66 en los microorganismos multirresistentes y de 0,50 y 0,33 en el resto (Tabla 33).

Teniendo en cuenta todos los datos obtenidos el 91% y el 95% de las muestras de *C. coli* y de *C. jejuni* respectivamente, presentaron resistencia al ácido nalidíxico, ocurriendo lo mismo con el ciprofloxacino. Alrededor del 80% de los microorganismos estudiados de ambas especies, fueron resistentes a la tetraciclina y un 27% de *C. coli* fue resistente a la estreptomicina. En menor medida aparecieron resistencias al resto de antibióticos (Figura 11).

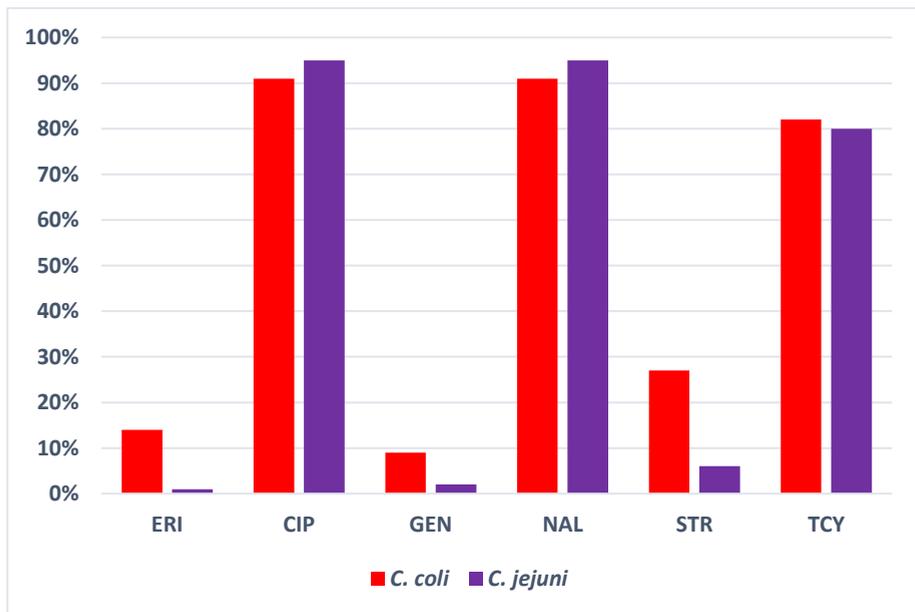


Figura 11. Resistencia de *C. coli* y *C. jejuni* a los antibióticos ensayados.

Tabla 34. Resistencia antimicrobiana de *C. coli* y *C. jejuni* según el origen de la muestra.

		Canal		Piel de cuello		Pollo de engorde		Embalaje		Total	Valor-p
		n+/n (%)									
NAL	<i>C. coli</i>	5/5 (100)	47/48 (97.9)	8/11 (72.7)	45/50 (90)	6/6 (100)	22/23 (95.7)	1/1 (100)	4 (100)	20/23 (87)	0.882
	<i>C. jejuni</i>	42/43 (97.7)		37/39 (94.9)		16/17 (94.1)		3/3 (100)		98/102 (96.1)	
CIP	<i>C. coli</i>	5/5 (100)	47/48 (97.9)	8/11 (72.7)	39/50 (78)	6/6 (100)	22/23 (95.7)	1/1 (100)	4 (100)	20/23 (87)	0.321
	<i>C. jejuni</i>	42/43 (97.7)		31/39 (79.5)		16/17 (94.1)		3/3 (100)		92/102 (90.2)	
ERI	<i>C. coli</i>	1/5 (20)	1/48 (2.1)	1/11 (9.1)	2/50 (4)	1/6 (16.7)	1/23 (4.3)	0	0	3/23 (13)	0.882
	<i>C. jejuni</i>	0/43		1/39 (2.6)		0/17		0		1/102 (0.01)	
TCY	<i>C. coli</i>	0	39/48 (81.3)	10/11 (90.1)	41/50 (82)	3/6 (50.0)	16/23 (69.6)	1/1 (100)	4 (100)	14/23 (60.9)	0.338
	<i>C. jejuni</i>	39/43 (90.7)		31/39 (79.5)		13/17 (76.5)		3/3 (100)		86/102 (84.3)	
GEN	<i>C. coli</i>	0	1/48 (2.1)	1/11 (9.1)	3/50 (6)	1/6 (16.7)	1/23 (4.3)	0	0	2/23 (8.7)	0.882
	<i>C. jejuni</i>	1/43 (2.1)		2/39 (5.1)		0/17		0		3/122 (0.03)	
STR	<i>C. coli</i>	1/5 (20)	6/48 (12.5)	4/11 (36.4)	7/50 (14)	1/6 (16.7)	2/23 (8.7)	0	0	6/23 (26.1)	0.681
	<i>C. jejuni</i>	5/43 (11.6)		3/39 (7.7)		1/17 (5.9)		0		9/122 (7.4)	

NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; ERI: eritromicina; TCY: tetraciclina; GEN: gentamicina; SRT: estreptomina

n: total de aislados; n*: total de aislados resistentes a los antimicrobianos ensayados

Los aislados de *Campylobacter* spp. mostraron una alta resistencia al ácido nalidíxico (90-100%) y al ciprofloxacino (78-100%), con resultados similares cuando son referidos a las especies (Tabla 34).

La resistencia a la tetraciclina fue significativa (69,6-100%) y menor en el caso de otros antimicrobianos: eritromicina (2,1-4,3%), gentamicina (2,1-6%) y estreptomycinina (8,1-14%), no encontrando diferencias importantes en ninguno de los casos, si tenemos en cuenta el origen de la muestra (Tabla 34).

En conjunto, según los datos obtenidos, el 87% y el 96,1% de las muestras de *C. coli* y *C. jejuni*, respectivamente, demostraron una notable resistencia al ácido nalidíxico, similar al ciprofloxacino (87% y 90,2%). La resistencia a la tetraciclina representó un 60,9% para *C. coli* y un 84,3% para *C. jejuni* y el 26,1% de los aislados de *C. coli* fue resistente a la estreptomycinina. La resistencia al resto antibióticos se observó en menor medida (Tabla 34). Todos los valores-p fueron $>0,05$ y no se observaron diferencias significativas entre la resistencia a los antibióticos y el origen de la muestra.

Finalmente, como se observa en la Tabla 35, haciendo una recopilación de los datos obtenidos, de las ciento veinticinco cepas de *Campylobacter* spp. analizadas, tres fueron sensibles a todos los antibióticos, procediendo de canal de pollo, piel de cuello y pollo de engorde. Otras tres cepas presentaron resistencia a un solo antibiótico (piel de cuello), mientras que la resistencia a dos antibióticos se presentó en veintitrés cepas. Las dieciséis cepas restantes presentaron resistencia a más de tres antibióticos, doce a cuatro de ellos, mientras que sólo una procedente de canal de pollo fue resistente a cinco antimicrobianos. Las tres cepas restantes fueron resistentes a todos los antibióticos analizados. De éstas, dos procedían de piel de cuello, mientras que la otra procedía de pollo de engorde.

Tabla 35. Número de cepas resistentes a un determinado número de antibióticos.

Nº de resistencias	Canal	Piel de cuello	Pollo de engorde	Embalaje	Total
0	1	1	1	0	3
1	0	3	0	0	3
2	8	9	6	0	23
3	32	30	14	4	80
4	6	5	1	0	12
5	1	0	0	0	1
6	0	2	1	0	3
Total	48	50	23	4	125

En la Figura 12 se muestra la distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos antibióticos, de *Campylobacter* spp. Tan solo un 2,4% de los microorganismos fue sensible a todos los antibióticos, mientras que el 20,8% presentó resistencia a una familia un 64,0% a dos clases. El 13% de las cepas presentó multirresistencia, de las cuales el 81% lo hizo a tres familias de antimicrobianos y el resto a cuatro.

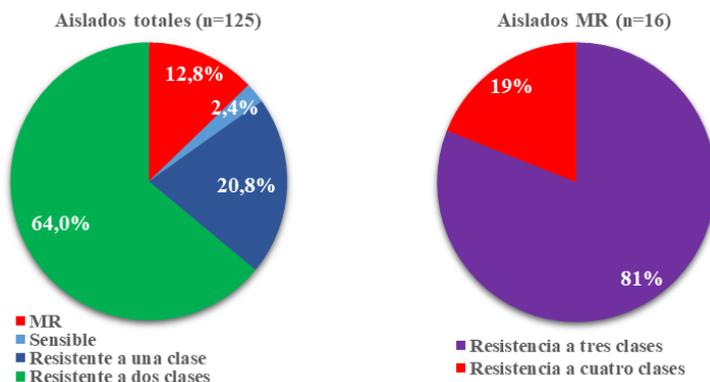


Figura 12. Distribución porcentual según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos de los aislados de *Campylobacter* spp.

En relación con los patrones de multirresistencia (Tabla 36), se encontraron cinco patrones diferentes, dos de ellos comunes para ambas especies. En todos los patrones aparecían las quinolonas y la tetraciclina.

Tabla 36. Patrones de multirresistencia en *C. coli* y *C. jejuni*.

Patrón	Origen	<i>C. coli</i> n ⁺ /n (%)	<i>C. jejuni</i> n ⁺ /n (%)
ERI/CIP/NAL/TCY	Canal	1/22 (5%)	0
CIP/NAL/GEN/TCY	Piel de cuello	0	1/103 (1%)
CIP/NAL/STR/TCY	Canal Piel de cuello Pollo de engorde	4/55 (7%)	6/103 (6%)
CIP/GEN/NAL/STR/TCY	Canal	0	1/103 (1%)
ERI/CIP/GEN/NAL/STR/TCY	Piel de cuello Pollo de engorde	1/22 (5%)	2/103 (2%)

ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; STR: estreptomina; TCY: tetraciclina. N⁺/n: número de cepas que presentan ese patrón/número de cepas totales de *Campylobacter* spp.

4.4 *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.

4.4.1 Estudio de la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium*.

Durante el año 2014 y primer trimestre de 2015 se realizaron controles sobre un total de cuatro mil quinientas cuatro muestras aguas de diferentes orígenes (Anexo II), destinadas a la detección, aislamiento e identificación de microorganismos del género *Enterococcus*. Dentro de los *Programas de Vigilancia Sanitaria de las Aguas de Consumo Humano* de la Generalitat Valenciana. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, aislándose e identificándose un total de noventa y dos cepas de *Enterococcus*, correspondiendo sesenta y cuatro a *E. faecium*, quince a *E. faecalis* y las trece restantes se identificaron como *Enterococcus* spp. (Tabla 37). El estudio llevó a cabo siguiendo los procedimientos internos

desarrollados en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia y acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación según la norma ISO 17025:2017. Posteriormente, la identificación se confirmó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia (Universitat de València) mediante la utilización del sistema automatizado Thermo Scientific Sensititre®.

Tabla 37. Presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* en las muestras obtenidas de aguas de consumo humano en la provincia de Valencia.

Años	n	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
2014	2812	54 (1,92%)	10 (0,36%)	9 (0,32%)
2015	1692	10 (0,59%)	5 (0,29%)	4 (0,24%)
Total	4504	64 (1,42%)	15 (0,33%)	13 (0,29%)

n: número de muestras totales

En el año 2014 se analizaron dos mil ochocientos doce muestras, detectando la presencia de *E. faecium* en cincuenta y cuatro de ellas (1,92%) y la de *E. faecalis* en diez aguas (0,36%). De las mil seiscientas noventa y dos muestras analizadas durante el primer trimestre del 2015, se detectaron diez muestras positivas en *E. faecium* (0,59%) y cinco en *E. faecalis* (0,29%) (Tabla 37).

Debido a la gran variabilidad en cuanto al origen de las muestras de aguas, y con el fin de poder realizar mejor el análisis de los resultados, se dividieron en cuatro grupos: pozos, fuentes y manantiales, canales y ríos, y red de abastecimiento público con o sin depósito intermedio. La distribución de especies por año y tipo de agua queda reflejada en la Tabla 38, observándose que la presencia de *E. faecium* prevalecía sobre *E. faecalis*.

Tabla 38. Número de muestras positivas en *E. faecium* y *E. faecalis* por año y origen.

	Año 2014			Año 2015		
	n	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	n	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Pozos	28	23 (82%)	5 (18%)	7	4 (57%)	3 (13%)
Fuentes y manantiales	27	23 (85%)	4 (15%)	6	5 (83%)	1 (17%)
Ríos	5	5 (100%)	-	0	-	-
Red	4	3 (75%)	1 (25%)	2	1 (50%)	1 (50%)
Total	64	54 (84%)	10 (16%)	15	10 (67%)	5 (13%)

n: número de muestras positivas durante el estudio

4.4.2 Estudio de la resistencia de *E. faecium* y *E. faecalis* a antibióticos.

Una vez aislados e identificados los microorganismos, se procedió a realizar el estudio de las resistencias a los diferentes antibióticos marcados por la legislación, como se detalla en Material y Métodos, agrupando las cepas según el tipo de agua del que procedían.

De las treinta y cinco cepas de enterococos (*E. faecium* y *E. faecalis*) aisladas de aguas de pozo (Tabla 39), *E. faecium* presentó tan solo resistencia a tres de los antibióticos ensayados, a la combinación de quinupristin/dalfopristin (44%), a la tetraciclina (11%) y a la vancomicina (7%). Por otro lado, para *E. faecalis*, se observa que un 63% de los aislamientos son resistentes a la tetraciclina, seguido de un 38% a la eritromicina, un 25% para tigeciclina y quinupristin/dalfopristin y un 13% a la ampicilina, cloranfenicol, gentamicina y vancomicina.

Tabla 39. Resistencia a antimicrobianos de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas de aguas de pozo.

	AMP	CHL	CIP	DAP	ERI	GEN	LNZ	Q/D	TEC	TCY	TIG	VAN	IM	MR
<i>E. faecium</i>														
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
4	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
7	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
24	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
25	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
26	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
32	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	0,16	-
34	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
35	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
45	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
49	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
53	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
54	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
55	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
58	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	0,25	+
63	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
64	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
65	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
72	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
78	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
79	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
R	0	0	0	0	0	0	0	13	0	3	2	0	0,05	1
%R	-	-	-	-	-	-	-	44	-	11	7	-	-	4
<i>E. faecalis</i>														
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,16	-
39	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
41	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
50	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	0,33	+
51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	0,08	-
66	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
70	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	0,41	+
73	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	0,16	-
R	0	1	1	0	3	1	0	2	0	5	2	1	-	2
%R	-	13	13	-	38	13	-	25	-	63	25	13	-	25

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; DAP: daptomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LNZ: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; TEC: teicoplanin; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; VAN: vancomicina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

Tabla 40. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas de fuentes y manantiales a los diferentes antibióticos.

	AMP	CHL	CIP	DAP	ERI	GEN	LNZ	Q/D	TEC	TCY	TIG	VAN	IM	MR
<i>E. faecium</i>														
5	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	0,16	-
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
9	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
10	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
11	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
12	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	0,16	-
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
15	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
16	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
17	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
18	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
19	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	0,25	+
20	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
21	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
22	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
37	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
38	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
40	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
43	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	0,16	-
56	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
59	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
60	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	0,16	-
61	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
68	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
69	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
74	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
75	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
76	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	0,16	-
R	0	0	0	1	0	0	0	19	0	4	0	3	-	1
%R	-	-	-	4	-	-	-	68	-	14	-	11	-	4
<i>E. faecalis</i>														
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
44	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	0,08	-
77	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
R	0	0	0	1	0	-	-							
%R	-	-	-	20	-	-	-							

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; DAP: daptomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LNZ: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; TEC: teicoplanin; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; VAN: vancomicina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multiresistencia; MR: Cepas multiresistentes

Se determinó la existencia de tres cepas multiresistentes (Tabla 39), una de *E. faecium* con resistencia a estreptograminas, tetraciclinas y gliciliclinas, y dos de *E. faecalis*, resistentes a quinolonas, macrólidos, tetraciclinas y gliciliclinas en uno de los casos y a anfenicoles, macrólidos, aminoglucósidos, estreptograminas y gliciliclinas en el otro. Los índices de

multirresistencia mayoritariamente fueron inferiores a 0,20 en las dos especies de microorganismos.

Como se muestra en la Tabla 40, de las veintiocho cepas de *E. faecium* procedentes de fuentes y manantiales, diecinueve presentaron una resistencia elevada la combinación de quinupristin/dalfopristin (68%), mientras que el nivel de resistencia fue bajo en el caso de la tetraciclina (14%) y vancomicina, (11%) y muy bajo para la tigeciclina (4%).

Sólo uno de los microorganismos aislados mostró multirresistencia, presentando un IM de 0,25. Por otra parte, las cepas de *E. faecalis* originarias de fuentes y manantiales fueron todas sensibles a todos los antimicrobianos ensayados, excepto una de ellas que únicamente fue resistente a la tigeciclina.

Tabla 41. Resistencia a antimicrobianos de las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas de aguas de red pública.

	AMP	CHL	CIP	DAP	ERI	GEN	LNZ	Q/D	TEC	TCY	TIG	VAN	IM	MR
<i>E. faecium</i>														
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
48	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
71	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
R	0	2	0	0	0	0	-	-						
%R	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>														
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
67	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,08	-
R	0	0	1	0	0	-	-							
%R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; DAP: daptomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LNZ: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; TEC: teicoplanin; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; VAN: vancomicina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

De las seis cepas de enterococos aisladas de aguas de la red pública, con o sin depósito intermedio (Tabla 41), se encontró que dos cepas de *E. faecium* eran resistentes a un solo antimicrobiano (quinupristin/ dalfopristin), mientras que

una cepa de *E. faecalis* presentó resistencia a la tetraciclina, no encontrándose ninguna cepa multirresistente. El IM fue en todos los casos inferior a 0,20.

Por último, en la Tabla 42, las cinco cepas aisladas de aguas procedentes de ríos y canales fueron de *E. faecium*, y sólo dos presentaron resistencias, una de ellas solamente a quinupristin/dalfopristin, mientras que la otra mostró resistencia a la eritromicina, quinupristin/dalfopristin, tetraciclina y tigeciclina, siendo la única cepa que mostró IM >0.20.

Tabla 42. Resistencia a antimicrobianos de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas de aguas de ríos.

	AMP	CHL	CIP	DAP	ERI	GEN	LNZ	Q/D	TEC	TCY	TIG	VAN	IM	MR
<i>E. faecium</i>														
33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
46	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	0,33	+
52	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
57	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0,08	-
62	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
R	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	1	0	0,08	1
%R	-	-	-	-	20	-	-	40	-	20	20	-	-	20

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; DAP: daptomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LNZ: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; TEC: teicoplanin; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; VAN: vancomicina; % R: Porcentaje de cepas resistentes al antibiótico ensayado; IM: Índice de multirresistencia; MR: Cepas multirresistentes

Teniendo en cuenta todos los datos obtenidos, como se muestra en la Figura 13, el 56% de las cepas de *E. faecium* fueron resistentes al combinado de antibióticos quinupristin/dalfopristin, pero sólo el 13% de las cepas de *E. faecalis* presentó resistencia a ese combinado. En cambio, el 40% de las cepas de *E. faecalis* fue resistente a la tetraciclina y el 20% a la tigeciclina, mientras que en *E. faecium* tan solo se detectaron un 13% y un 5% respectivamente. Por otra parte, *E. faecium* no presentó resistencias al cloranfenicol, ciprofloxacino y gentamicina, pero si se detectaron en *E. faecalis*, con una prevalencia del 7% en todos los casos.

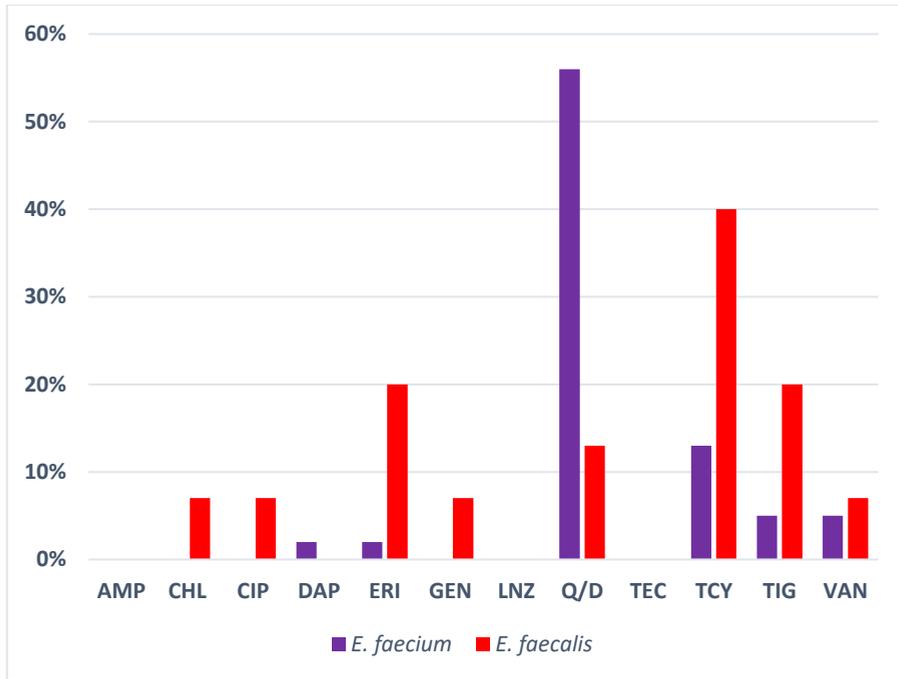


Figura 13. Resistencia de *E. faecium* y *E. faecalis* a los antibióticos ensayados.

Si se tiene en cuenta el origen de las muestras (Tabla 43), hay que destacar el alto nivel de resistencia de las cepas aisladas de *Enterococcus* spp. al complejo quinupristin/dalfopristin, que oscila entre un 57,6% cuando el agua procede de ríos y un 33,3% cuando procede de la red. También se encuentra un nivel elevado de resistencias a la tetraciclina (22,8-12,1%). No se encontraron resistencias a la ampicilina, al linezolid ni a la teicoplanina. Teniendo en consideración la especie, en general *E. faecalis* mostró un mayor número de resistencia a los diferentes antimicrobianos testados que *E. faecium*. Además, en todos los casos, el valor-p fue superior a 0,05, por lo que se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre la resistencia a los diferentes antibióticos y el origen de la muestra.

Tabla 43. Resistencia a antimicrobianos de *E. faecium* y *E. faecalis* según el origen de la muestra.

		Pozos		Fuentes y manantiales		Ríos		Red		Valor-p
		n ⁺ /n (%)								
AMP	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	-	0/28 (0)	-	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	
	<i>E. faecalis</i>	0/8 (0)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
CHL	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	1/35 (2,8)	0/28 (0)	-	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	0,649
	<i>E. faecalis</i>	1/8 (12,5)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
CIP	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	1/35 (2,8)	0/28 (0)	-	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	0,649
	<i>E. faecalis</i>	1/8 (12,5)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
DAP	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	0/35 (0)	1/28 (3,6)	1/33 (3)	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	0,623
	<i>E. faecalis</i>	0/8 (0)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
ERI	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	3/35 (8,6)	0/28 (0)	-	1/5 (02)	1/5 (20)	0/4 (0)	-	0,103
	<i>E. faecalis</i>	3/8 (37,5)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
GEN	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	1/35 (2,8)	0/28 (0)	-	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	0,649
	<i>E. faecalis</i>	1/8 (12,5)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
LNZ	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	-	0/28 (0)	-	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	
	<i>E. faecalis</i>	0/8 (0)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
Q/D	<i>E. faecium</i>	13/27 (48,1)	15/35 (42,8)	19/28 (67,8)	19/33 (57,6)	2/5 (40)	2/5 (40)	2/4 (50)	2/6 (33,3)	0,523
	<i>E. faecalis</i>	2/8 (25)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
TEC	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	-	0/28 (0)	-	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	
	<i>E. faecalis</i>	0/8 (0)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	
TCY	<i>E. faecium</i>	3/27 (11,1)	8/35 (22,8)	4/28 (14,3)	4/33 (12,1)	1/5 (20)	1/5 (20)	0/4 (0)	1/6 (16,6)	0,707
	<i>E. faecalis</i>	5/8 (17,8)	-	0/5 (0)	-	-	-	1/2 (50)	-	
TIG	<i>E. faecium</i>	2/27 (7,4)	4/35 (11,4)	0/28 (0)	1/33 (3)	1/5 (20)	1/5 (20)	0/4 (0)	-	0,305
	<i>E. faecalis</i>	2/8 (25)	-	1/5 (20)	-	-	-	0/2 (0)	-	
VAN	<i>E. faecium</i>	0/27 (0)	1/35 (2,8)	3/28 (10,7)	3/33 (9)	0/5 (0)	-	0/4 (0)	-	0,480
	<i>E. faecalis</i>	1/8 (12,5)	-	0/5 (0)	-	-	-	0/2 (0)	-	

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; DAP: daptomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LNZ: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; TEC: teicoplanin; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; VAN: vancomicina

n: total de aislados; n⁺: total de aislados resistentes

Recopilando los datos anteriores (Tabla 44), treinta y dos cepas, de todos los orígenes, fueron sensibles a todos los antibióticos. Treinta y cuatro aislados, también de todos los tipos de aguas, presentaron resistencia a un solo antibiótico. La resistencia a dos y tres antibióticos sólo fue detectada en aguas de pozo, así como en fuentes y manantiales. En el agua procedente de pozo se determinó la presencia de una cepa resistente a cuatro antimicrobianos y de otra resistente a cinco, mientras que en el agua de ríos se aisló una resistente a cuatro antibióticos.

Tabla 44. Número de cepas resistentes a un determinado número de antimicrobianos.

Nº de Resistencias	Pozo	Fuentes y manantiales	Red	Ríos	Total
0	14	12	3	3	32
1	15	15	3	1	34
2	3	5	-	-	8
3	1	1	-	-	2
4	1	-	-	1	2
5	1	-	-	-	1
Total					79

En la Figura 14 se muestra la distribución porcentual según el número de resistencias a los diferentes grupos antibióticos de *Enterococcus* spp. El 40,5% de los microorganismos fueron sensibles a todas las familias de antibióticos, mientras que el 43,0% presentó resistencia a un tipo, un 11,4% fue resistente a dos clases y tan solo un 5% de las cepas fueron multirresistentes, de las cuales un 75% presentó resistencia a tres familias, mientras que el 25% lo hizo a cinco.

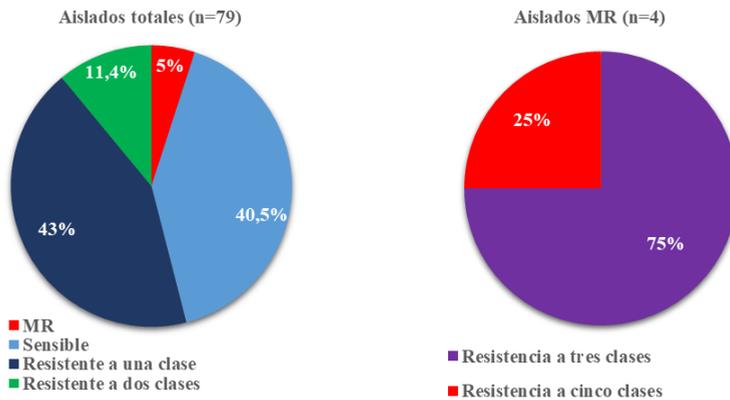


Figura 14. Distribución porcentual, según el número de resistencias a los diferentes grupos de antibióticos, de los aislados de *Enterococcus* spp.

Dos cepas de *E. faecium* y dos a *E. faecalis* presentaron multirresistencia, con patrones diferentes entre ellas, y resistentes a tres, cuatro o cinco familias de antimicrobianos. En todos los casos los microorganismos presentan resistencia a la tetraciclina (Tabla 45).

Tabla 45. Patrones de multirresistencia a antimicrobianos en *E. faecium* y *E. faecalis*.

Patrón	Origen	<i>E. faecium</i> n ⁺ /n (%)	<i>E. faecalis</i> n ⁺ /n (%)
Q-D /TCY/VAN	Fuentes y manantiales	1/64 (1,5%)	0
CIP/ERI/TCY/TIG	Pozos	0	1/15 (6,6%)
ERI/Q-D /TCY/TIG	Canales y ríos	1/64 (1,5%)	0
CHL/ERI/GEN/Q-D /TCY	Pozos	0	1/15 (6,6%)

AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacino; DAP: daptomicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; LNZ: linezolid; Q/D: quinupristin/dalfopristin; TEC: teicoplanin; TCY: tetraciclina; TIG: tigeciclina; VAN: vancomicina

n: total de aislados; n⁺: total de aislados resistentes

5. DISCUSIÓN

5 Discusión

La OMS, indica que *en las últimas décadas, la mayoría de los países han registrado un importante aumento en la incidencia de enfermedades provocadas por la presencia de microorganismos en los alimentos, en particular de agentes patógenos como Salmonella, Campylobacter o Escherichia coli entre otros, lo cual constituye un importante problema de salud pública....* Esto ha llevado en los últimos años a que el estudio de la prevalencia de microorganismos zoonóticos transmitidos por los alimentos sea un objetivo a nivel mundial, y que su vigilancia en toda la UE forme parte importante de los controles establecidos, con el fin de seguir su evolución y poder aplicar las medidas más adecuadas para proteger la población frente a las zoonosis relacionadas con la cadena alimentaria (Wielinga y Schlundt, 2013; Shariff, 2019). Por otra parte, la resistencia a los antimicrobianos representa un desafío importante para la salud y, debido a la aparición y transmisión de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas en humanos, animales y el medio ambiente, se ha calificado como el *problema de salud por excelencia* (Robinson *et al.*, 2016; Aenishaenslin *et al.*, 2021).

En esta Tesis Doctoral se ha hecho un seguimiento y estudio sobre la incidencia y resistencia antimicrobiana de las bacterias relacionadas y comensales encontradas en distintos tipos de alimentos obtenidos en la provincia de Valencia. El estudio se centró en la búsqueda de *Salmonella* spp., el indicador comensal *Escherichia coli*, *Campylobacter coli* y *C. jejuni* y *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* a partir de diferentes muestras de alimentos, así como en la determinación de las posibles resistencias antibióticas que estos microorganismos pudieran presentar. Para ello, se puso a punto una tecnología automatizada en el Laboratorio de Microbiología de la

Universitat de València, mediante el uso del sistema Thermo Scientific Sensititre®, descrito en Material y Métodos.

5.1 *Salmonella* spp.

En la actualidad, la salmonelosis sigue siendo la segunda zoonosis más común en humanos en la UE, después de la campilobacteriosis, teniendo su origen en la ingesta de alimentos contaminados con esta bacteria. En este estudio se analizaron más de siete mil quinientas muestras, alcanzando una tasa de contaminación por *Salmonella* spp. de alrededor de un 1,20% (Tabla 2).

Centrándonos en la presencia del microorganismo según tipo de alimento, no se detectó contaminación en preparados de frutas y hortalizas, lácteos o huevos frescos, y la incidencia fue relativamente baja en los alimentos cuyo origen era el pescado o moluscos (Tabla 2).

Tradicionalmente, las frutas y hortalizas no se han reconocido como reservorios de patógenos humanos como *Salmonella*, aunque en las últimas décadas, los nichos de estos organismos han cambiado debido a múltiples factores como la contaminación de las aguas de riego, el uso de estiércol sin tratar, malas prácticas de higiene, etc., lo que ha llevado a que actualmente diferentes autores determinaran la presencia de este microorganismo en este tipo de alimentos (Lenzi *et al.*, 2020; Ehuwa *et al.*, 2021; Corredor-García *et al.*, 2021). Sin embargo, Devleeschauwer *et al.* (2017) señalaron que, aunque los brotes de salmonelosis debidos a frutas y hortalizas están bien documentados, su aparición sigue siendo esporádica.

En cuanto a los huevos, los datos sobre la prevalencia de contaminación encontrada en la literatura, es prácticamente nula, pero, los informes de la EFSA-ECDC desde 2014 indican que la proporción de huevos con *Salmonella*

suele ser inferior al 0,5%, siendo del 0,37% en el último informe disponible (EFSA-ECDC, 2019b), mientras que los datos reportados por España en los años de este estudio (MAPAMA, 2017^a, 2017b, 2018), registran unas tasas mayores (2%, 8% y 4%), superiores en ambos casos a los resultados de nuestro trabajo, y apuntando en el conjunto de la UE a un descenso marcado en los índices de contaminación sobre años anteriores, lo que podría reflejar el impacto de las diferentes medidas que han puesto en marcha por las diferentes administraciones. En el caso de la leche y los productos lácteos, no se detectó la presencia del microorganismo, resultados en consonancia con el estudio de Ganz *et al.* (2020) sobre la prevalencia de *Salmonella* spp. en quesos. Estos investigadores tan solo hallaron el microorganismo en el 0,1% de las muestras examinadas, siendo siempre quesos de leche cruda. Otro estudio similar en EEUU sobre este tipo de quesos (USFDA, 2016) determinó la presencia de *Salmonella* spp. en el 0,19% de los casos.

En nuestro trabajo, el nivel más alto de incumplimiento de los criterios de seguridad alimentaria de *Salmonella* spp., se encontró en alimentos de origen cárnico, tanto en carne fresca como procesada de ave (3,25 y 4%), así como en carne fresca y procesada de ganado (4,43 y 2,72%) (Tabla 2). Es importante comentar que se detectó un aumento de la incidencia en el último año (datos no mostrados), de forma similar a la tendencia detectada en el conjunto de la UE. Este aumento durante el último año de estudio podría deberse tanto a la mejora de la vigilancia y mejores métodos diagnósticos utilizados, lo que llevaría a un aumento en el número de casos detectados (EFSA-ECDC, 2017^a), como al origen de las muestras utilizadas (Campos *et al.*, 2019; Machado Junior *et al.*, 2020) o a una relajación en la aplicación de la reglamentación (Boqvist *et al.*, 2018). Diferencias significativas en cuanto a la prevalencia del microorganismo, las encontramos también en los informes anuales del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente

(MAPAMA 2017^a, 2017b, 2018), que comunicó la presencia de *Salmonella* fundamentalmente en alimentos de origen cárnico, variando según el año la incidencia en carnes de porcino (6%, 20% y 12%), bovino (6%, 3% y 1%) y aves (10%, 5% y 0,5%), apreciándose diferencias sustanciales, no sólo en sus resultados según el año de estudio, sino también con nuestro análisis. Diferentes autores apuntan a que múltiples factores, como pueden ser el matadero de origen de las muestras, sacrificio del animal, procesamiento de las canales y, en su caso, la preparación final del alimento y sus productos, son fundamentales a la hora de encontrar mayor o menor contaminación en las muestras analizadas, dando lugar a índices de prevalencia muy dispares, aun tratándose del mismo tipo de muestra (Campos *et al.*, 2019; Machado Junior *et al.*, 2020).

En cuanto a las resistencias a antibióticos halladas en las cepas aisladas de *Salmonella* spp., descritas en la Figura 7, hay que destacar de forma general, las altas tasas de resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina. En el caso de las quinolonas, se llegó alrededor de un 26% de resistencia al ciprofloxacino y de un 24% en el caso del ácido nalidíxico, mientras que para otros antimicrobianos la resistencia fue menor (Figura 7). Aunque estos resultados están en consonancia con los datos obtenidos en España y en la UE, ya que los antibióticos frente a los que se detectó mayor resistencia coinciden (MAPAMA 2017^a, 2017b, 2018; EFSA-ECDC, 2016, 2017^a, 2018^a), los porcentajes difieren. Se ha descrito que la versatilidad en el número y tipo de muestras introducen una fuente importante de variación en los resultados (EFSA, 2017a, 2017b).

Por otro lado, todas las cepas fueron sensibles a las cefalosporinas (cefotaxima y ceftazidima), sin embargo, algunos autores refieren este tipo de resistencias en aislados de *Salmonella* spp. (Peruzy *et al.*, 2020). La resistencia a la colistina tuvo una incidencia muy baja (Figura 7), apareciendo sólo en aislados

de carne fresca de ganado (Tabla 8). Este antimicrobiano se ha utilizado durante muchos años en el ganado y también se utiliza cada vez más en la medicina humana, donde ha sido uno de los antimicrobianos de último recurso en infecciones bacterianas Gram negativas extremadamente resistentes (EFSA-ECDC, 2017b). Estas resistencias son por lo general poco comunes entre *Salmonella* spp. y *E. coli* en aislados recuperados de animales productores de alimentos, tales como cerdos de engorde, terneros, ganado, aves de corral y canales/carnes derivadas de estos animales. (EFSA-ECDC, 2020).

El porcentaje de resistencia al cloranfenicol registrado en el presente estudio, aunque moderado, sigue siendo alarmante ya que el uso de este antibiótico está estrictamente prohibido en la producción de alimentos animales en todos los estados miembros de la UE. Datos similares se han obtenido en otros estudios, lo que podría explicarse por el uso ilegal y fraudulento de este antimicrobiano en las prácticas veterinarias (Trevisani *et al.*, 2014; Chiesa *et al.*, 2017).

La mayor resistencia al ciprofloxacino y al ácido nalidíxico, que llega a alcanzar un 100% en este último, se encontró en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de carne fresca de ave (Tabla 8), mientras que los preparados de aves presentaron resistencia no solo al ciprofloxacino y al ácido nalidíxico, aunque en menor medida que en el caso anterior, sino también a la ampicilina y a la tetraciclina (Tabla 8). En el caso de la carne fresca de ganado, así como de los preparados de dicha carne, el porcentaje cepas resistentes a la ampicilina y a la tetraciclina fue muy alto, mientras que a las quinolonas alcanzo sólo un 11% (Tabla 8).

El valor-p en el caso de la ampicilina, el ciprofloxacino, el ácido nalidíxico, la colistina y la tetraciclina, fue inferior a 0,05, lo que indicó diferencias

significativas en relación con el origen de la muestra y la resistencia a estos antibióticos, lo que nos indica que la presencia de estas resistencias están altamente relacionadas con el origen de la muestra. Resultados acordes con los diferentes informes de la EFSA-ECDC sobre la vigilancia de las zoonosis transmitidas por los alimentos y de los agentes zoonóticos y de las resistencias a los antimicrobianos.

Se ha descrito la presencia de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos en los alimentos. Peruzzy *et al.* (2020), en un estudio realizado analizando muestras de alimentos en Italia durante cinco años, encontraron altos niveles de resistencia a antimicrobianos en *Salmonella* spp.: tetraciclina (96%), ciprofloxacino (84%), ampicilina (79%), ácido nalidíxico (76%) y trimetoprim-sulfametoxazol (69%), mientras que bajo a cefotaxima (17,4%), cloranfenicol (10,1%) y ceftazidima (6,2%). Sin embargo, los niveles de resistencia descritos en la literatura varían dependiendo, en muchos casos, del país de estudio, aunque en general los antibióticos implicados son los mismos. Castro-Vargas *et al.* (2020) realizaron una revisión utilizando artículos de todo el mundo (doce de América, seis de África, once de Europa y diecisiete de Asia) sobre resistencias a antimicrobianos en aislados de *Salmonella* spp. de carne de pollo, determinando niveles bajos de resistencia (5% y 8%) asociados a ciprofloxacino y cloranfenicol. Encontraron niveles muy bajos de resistencia para ceftazidima y cefotaxima (0% y 2,2%), y no detectó resistencia a la familia de los carbapenemas como el meropenem.

Mąka y Popowska (2016) revisaron datos sobre la resistencia en aislados de *Salmonella* spp. de origen alimentario en países de diferentes regiones del mundo, hallando, en mayor o menor medida, a todos los antibióticos analizados en los distintos países. Los datos sobre España en este informe indican que la resistencia al ácido nalidíxico en aislados de pollo y derivados alcanzó el 100%, lo que se encuentra en consonancia con los datos de nuestro

trabajo. Por otra parte, Roth *et al.* (2019) indican que el elevado porcentaje de resistencia a tetraciclina y ampicilina detectado, tanto en España como en otros países de la UE, es debido a que el uso de estos antimicrobianos está permitido para su utilización en animales.

Aunque son escasas las referencias en la bibliografía sobre la prevalencia de resistencias en *Salmonella* spp. procedente de moluscos y pescado, se ha referido que las principales resistencias antimicrobianas detectadas fueron contra ampicilina, ácido nalidíxico, sulfonamidas y tetraciclinas (de Alcântara Rodrigues *et al.*, 2020). Datos que se encuentran en consonancia con nuestro estudio (Tabla 9).

Por otra parte, es conocida la importancia de la aparición de cepas de microorganismos resistentes a más de un antibiótico o incluso de la aparición de multirresistencias. La creciente evolución de los aislados de *Salmonella* spp. resistentes a múltiples antimicrobianos constituye un problema sobre el control de esta bacteria. La resistencia a los antimicrobianos convencionales como ampicilina, cloranfenicol o sulfonamidas se ha vuelto relativamente frecuente en aislados clínicos en las últimas décadas, asociándose este aumento de aislamientos multirresistentes con un aumento en las tasas de mortalidad, riesgo de infección y hospitalización (Florez-Cuadrado *et al.*, 2018).

Según datos de la EFSA-ECDC (2017^a), en los aislados de carne de cerdo, los niveles más altos de resistencia correspondieron a ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas, en línea con los datos de aislados humanos. En el caso de la carne bovina, *Salmonella* presenta menor resistencia, excepto para tetraciclina y tigeciclina.

Durante la realización de esta Tesis se ha encontrado que un alto porcentaje de las cepas aisladas son simultáneamente resistentes al ácido nalidíxico y al

ciprofloxacino (82% de las aisladas de carne fresca de ave) (Tabla 3). Por otra parte, de las noventa cepas analizadas, dieciséis presentan multirresistencia (Tabla 10), con diferentes patrones, destacando que en el 100% de los casos aparece implicada la ampicilina. También hay que destacar que en tres aislados de preparados de ganado se encontró resistencia a seis antimicrobianos (Tabla 10). Otros autores (Zhang *et al.*, 2018; Jajere, 2019; Peruzy *et al.* 2020), informan de resultados similares de corresponsencias y multirresistencias en su investigación. Estos datos son de particular preocupación, especialmente en el caso de las quinolonas, ya que son consideradas como el tratamiento de primera línea en salmonelosis invasivas en humanos, categorizadas según la OMS como *antimicrobianos prioritarios de importancia crítica*, y que también se pueden utilizar en medicina veterinaria cuando no existen antimicrobianos alternativos (EMA, 2020). Además, el que tres de los aislamientos analizados mostraran una resistencia simultánea a las quinolonas, ampicilina y trimetoprim es muy preocupante, puesto que la ampicilina y el trimetoprim se utilizan como terapias de segunda línea en humanos que no responden a los antibióticos de primera elección.

5.2 *E. coli.*

El número de muestras positivas en *E. coli* aisladas mediante las normas ISO 16649-2:2001 y 16649-3:2005 durante los años 2014 y 2015 alcanzó una tasa de alrededor de un 4% (Tabla 11), incluyendo en las más de tres mil muestras analizadas, en torno a un 68% de aguas para consumo humano proveniente de la red pública, pozos, fuentes y manantiales, y alrededor de un 20% de preparados de ganado. El resto estaba constituido por alimentos preparados de ave, moluscos, lácteos y frutas y hortalizas frescas (Tabla 12).

La mayor incidencia de contaminación se dio en frutas y hortalizas frescas con un 95% en 2014 y un 75% en 2015, seguido de moluscos (25,9% en 2014 y 18,1% en 2015), encontrándose valores más bajos en el resto de los alimentos analizados (Tabla 13).

No se han encontrado en la literatura referencias a la prevalencia de *E. coli* comensal o genérica en alimentos, estando la información referida prácticamente en su totalidad a *E. coli* verotoxigénica, al igual que en los informes europeos o españoles (EFSA-ECDC, 2016, 2017a; MAPAMA 2017a, 2017b). Sin embargo, la detección y cuantificación de *E. coli* constituye uno de los parámetros más importantes para evaluar la calidad sanitaria de un alimento y, fundamentalmente *E. coli* se considera un microorganismo indicador, comensal omnipresente en los mamíferos y capaz de proporcionar pistas relevantes sobre la propagación de la resistencia a los antibióticos (EFA-ECDC, 2016, 2017a). De hecho, el patrón y la frecuencia de resistencia en cepas comensales de *E. coli* se cree que es un marcador eficaz de la presión selectiva aplicada por el uso de antibióticos en animales, y de la futura resistencia que se pueda encontrar en otros microorganismos patógenos, ya que *E. coli* comensal puede considerarse como un reservorio de determinantes de las resistencias adquiridas (van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Ceccarelli *et al.*, 2020).

Los resultados de nuestro trabajo indican que las cepas aisladas fueron resistentes principalmente (de mayor a menor) al ciprofloxacino, tetraciclina, ampicilina, trimetoprim y al ácido nalidíxico, encontrando tasas muy bajas de resistencia al resto de antibióticos (Figura 9).

Los datos analizados por tipo de alimento difieren considerablemente, encontrando una elevada resistencia a la ampicilina, a la tetraciclina y a las quinolonas en derivados cárnicos de ave y ganado (Tablas 14 y 15), y en

aislados de moluscos se encontraron resistencias a prácticamente todos los antimicrobianos ensayados (Tabla 16). En frutas y verduras la resistencia es moderada a la ampicilina y al ciprofloxacino (Tabla 17), en los lácteos al ciprofloxacino, tetraciclina y trimetoprim (Tabla 19), mientras que, en las aguas de consumo humano a la ampicilina, tetraciclina y ciprofloxacino (Tabla 18). La resistencia a la cefotaxima alcanzó su porcentaje más alto en las bacterias aisladas a partir de moluscos (Tabla 16).

En España, el MAPAMA informó en 2014 que las resistencias a antimicrobianos en *E. coli* aislado de pollos de engorde se produjeron frente a ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, gentamicina y tetraciclina, y siempre por encima de la media europea (MAPAMA, 2017a). Según este mismo organismo, en 2015 los aislados de *E. coli* estudiados fueron procedentes de cerdos de engorde, y presentaron el mayor porcentaje de resistencia frente a la tetraciclina con un 89,4%, ampicilina con un 82,4% y trimetoprim con un 74,7%, mientras que frente a cefotaxima apenas se detectaron resistencias (MAPAMA, 2017b). En ambos casos el patrón de resistencias es similar, aunque difieren los porcentajes si los comparamos entre ellos y también con nuestro trabajo, diferencia que puede ser explicada por los distintos orígenes de las muestras utilizadas para cada estudio.

Caruso (2018) describe una prevalencia de resistencias similar a la de nuestro estudio, con hasta un 58% y 47%, respectivamente, para ciprofloxacino y ácido nalidíxico en pollos, mientras que la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación se encontró más raramente, 1,4% en porcinos y 2,4% en bovinos y 10,2% de corral. También encontramos datos similares descritos por otros autores. Ceccarelli *et al.* (2020) en un estudio realizado sobre la resistencia a los antimicrobianos en *E. coli* comensal aislado de diferentes animales para el consumo humano en varios países europeos, refieren que independientemente de la especie animal, las resistencias más altas se

observaron para la ampicilina, tetraciclina y trimetoprim. *E. coli* aislado de pollos de engorde mostró el nivel más alto de resistencia a las quinolonas, siendo también elevada la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftazidima, mientras que los niveles más bajos fueron para el meropenem, y tigeciclina. Además, se encuentra una correlación significativa en muchos casos entre la prevalencia de resistencias y la tasa de utilización de antibióticos en granjas en cada país (Chantziaras *et al.*, 2014; Baudoin *et al.*, 2021).

En el estudio realizado por Pesciaroli, *et al.* (2020) en carne de pollo se determinó un índice de resistencias superior al 50% para tetraciclinas, sulfonamidas y ampicilina, similares a los datos de resistencia a estos tres agentes descritos en la mayor parte de la ganadería europea (EFSA-ECDC, 2016, 2017a), atribuyendo estos niveles a un uso extendido y a largo plazo de estos antimicrobianos en agricultura. Sin embargo, la prevalencia de resistencia a cefalosporinas de tercera generación fue del 5%, inferior a los datos obtenidos en nuestro estudio para preparados de aves (Tabla 14).

La mayoría de los microorganismos resistentes a ciprofloxacino en aislados de preparados de aves y ganado y productos de origen lácteo, también lo fueron al ácido nalidíxico, lo que mostraba un fenotipo clásico de resistencia a quinolonas. Sin embargo, no se encontró el mismo comportamiento para las cepas derivadas de aguas ni de frutas y hortalizas frescas, ya que la resistencia al ciprofloxacino alcanzó un 40% y un 25% respectivamente, mientras que la tasa de resistencia al ácido nalidíxico, al igual que la corresponsencia a ambos compuestos se situó alrededor de un 3%. Este comportamiento es difícil de explicar, no habiendo encontrado en la bibliografía datos ni justificación al respecto en aislados de *E. coli*. Sin embargo, sí que se ha descrito un fenotipo inusual en gramnegativos, pero frecuente en *Stenotrophomonas maltophilia*, consistente en sensibilidad a ácido nalidíxico y resistencia a ciprofloxacino,

sin que exista una explicación clara de este comportamiento (Calvo *et al.*, 2011).

Aproximadamente el 27,93% (31/111) de las cepas de *E. coli* aisladas fueron multirresistentes, presentando resistencia tres o más familias de antimicrobianos, con veinticinco patrones diferentes (Tabla 22). En el caso de los microorganismos aislados a partir de preparados de aves y de preparados de ganado, la multirresistencia alcanzó un 50%, en aislados de moluscos un 40%, en los de aguas de consumo humano un 24%, en los obtenidos de lácteos un 25% y en los de frutas y verduras frescas un 1%.

En la actualidad resulta especialmente preocupante, no sólo la aparición de multirresistencias, sino que el indicador comensal *E. coli* procedente de animales productores de alimentos pueda contribuir a la diseminación de la resistencia a las BLEE y a la transferencia de genes de resistencia a bacterias patógenas humanas, como *Salmonella* spp. (Ramos *et al.*, 2020). Los datos de la UE para 2015 mostraron que el 8% de los aislados de carne de cerdo presentaron BLEE y 1,1% betalactamasas AmpC, mientras que, en carne bovina, la prevalencia total encontrada fue del 5% de *E. coli* con fenotipo BLEE y 0,3% con fenotipo AmpC (EFSA-ECDC, 2017a).

De las ciento once cepas aisladas en nuestro trabajo, de *E. coli*, trece se consideraron posibles productoras de BLEE, lo que representa un 12% que mostraban fenotipos compatibles con la presencia de la enzima (Tabla 23). La confirmación mediante el método de E-test nos permitió corroborar que nueve de estas trece cepas eran productoras de BLEE (Tabla 25). Sin embargo, la detección mediante el método de sinergia de doble disco o de discos combinados con inhibidor arrojó en ambos casos un número menor de cepas productoras de BLEE. Según Navarro *et al.* (2011), la detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión

fenotípica y esto viene condicionado por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia, lo que sugiere que se podría llegar a diferencias en los resultados obtenidos según el método empleado.

Se observan diferencias aparentemente importantes en la proporción de las BLEE, según el tipo de alimento del que procedían los microorganismos. En cepas aisladas a partir de moluscos la incidencia fue del 20% (4/20) y en aislados de preparados de carne de aves y de lácteos se alcanzó un 17% (1/6 y 2/12 respectivamente). Sin embargo, en el resto de las cepas fue menor, 6% (1/16) cuando procedían de preparados de ganado, y un 3% (1/29) si se obtuvieron a partir de aguas de consumo humano, no detectándose en las que provenían de frutas y verduras frescas, aun a pesar de la alta tasa de contaminación por *E. coli* en estos alimentos. Estas diferencias no son significativas estadísticamente ($G = 2.7169$, X-squared, $gl = 3$, $p = 0.44$).

En el estudio realizado por Ramos *et al.* (2020) se compara la prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE detectadas en animales productores de alimentos de diferentes países europeos y no europeos. Aparte del Líbano, Alemania, China, Portugal y Tailandia, donde se encontraron altos porcentajes entre los aislados de cerdos (superiores a un 25%), solo se registraron porcentajes de bajos a moderados (1%-25%) en los demás países. En cuanto a los aislamientos de bovinos, los resultados generales apuntaban a porcentajes más bajos que en los porcinos, aunque la proporciones seguían siendo elevadas en Alemania, los Países Bajos, el Reino Unido y China. En relación con la presencia de *E. coli* productora de BLEE aislada de aves de corral, hubo una incidencia muy alta en Alemania, Francia e Italia.

En este contexto, resulta complicado el comparar nuestros resultados con otros de la literatura o con los reportados por los organismos oficiales EFSA,

MAPAMA o MAPA, ya que existe una gran variabilidad de datos, que podría ser explicada por las diferencias en las prácticas de cría, el uso de antibióticos, métodos de aislamiento y tamaños de muestra, que varían mucho entre países o incluso entre granjas, lo que puede dar lugar a diferentes sensibilidades de detección. Por eso, la comparación de los datos de prevalencia debe, en algunos casos, realizarse con cautela (Ramos *et al.*, 2020).

El aumento resistencia a las fluoroquinolonas en cepas de *E. coli*, muchas de las cuales también expresan β -lactamasas que confieren resistencia a las cefalosporinas, es cada vez más significativo, debido a que son antibióticos ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas, tanto en humanos como en veterinaria (Rice, 2012). En Alemania, se analizaron muestras carne procedente de ganado bovino de carne y de granjas de granjas lecheras, aislándose *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación en el 70% de las granjas de ganado vacuno y el 85% de las granjas lecheras (Hille *et al.*, 2017). Un estudio en Francia realizado por Plassard *et al.* (2021) mostró que las cepas de *E. coli* aisladas en una granja productoras de BLEE, presentaban en la mayoría de los casos resistencia a múltiples fármacos.

En nuestro trabajo, el patrón más común en cepas de *E. coli* que eran corresistentes a quinolonas y cefalosporinas de tercera generación, fue la resistencia a ciprofloxacino, ácido nalidíxico, cefotaxima, ceftazidima, que alcanzó alrededor de un 7% del total de aislados, con o sin resistencias adicionales (Tabla 22). En un estudio realizado por Niero *et al.* (2018) en doscientas granjas avícolas en Italia se encontró resistencia a las quinolonas y cefalosporinas de tercera generación en un alto porcentaje de los aislados de pollo. En definitiva, los informes sobre la presencia de *E. coli* en animales productores de alimentos con resistencia a antibióticos *de importancia crítica*, especialmente a las quinolonas, pero también a las cefalosporinas de tercera generación y a la colistina, están aumentando, lo que supone un riesgo para la

salud humana (Cummings *et al.*, 2013; EFSA-ECDC, 2017a; Myrenås *et al.*, 2018; Sletteemeås *et al.*, 2019).

En relación con la prevalencia de *E. coli* asociada a moluscos, o en general a alimentos de origen marino, aunque es muy poca la información encontrada en la bibliografía, Lamon *et al.* (2020) detectaron un 100% de contaminación en bivalvos en Italia, mientras que Sellera *et al.* (2018) describen por primera vez la identificación de *E. coli* productora de BLEE en peces silvestres en un área contaminada en la costa atlántica sur de Brasil, aduciendo la preocupación que supone la rápida diseminación de *E. coli*, entre otras enterobacterias, en áreas costeras, ya que esta bacteria es un constituyente de la microbiota intestinal de los peces. En nuestro trabajo la presencia de cepas multirresistentes en este tipo de alimentos es elevada (40%), destacando la existencia de tres cepas resistentes a antibióticos de siete familias diferentes y una resistente a antimicrobianos de seis grupos diferentes (Tabla 23), y, además, el 30% de los aislados son productores de BLEE (cepas 33, 36, 41 y 78). No se ha encontrado en la literatura referencia a la presencia de BLEE en moluscos, sin embargo, sí que se han encontrado estudios en pescados. Sivaraman *et al.* (2020) realizaron un trabajo sobre la prevalencia de BLEE en *E. coli* aislado de pescados en mercados minoristas de Assam (India), que alcanzó el 68%, presentando además estas cepas multirresistencia asociada al menos a cuatro grupos de antimicrobianos, mientras que Brahmi *et al.* (2015) detectaron una incidencia del 7% en muestras de peces capturados en el mar Mediterráneo. La diferencia en los resultados obtenidos en los distintos estudios podría explicarse por la diferente localización en la captura de los peces, ya que una afluencia de aguas residuales sin tratar, efluentes industriales y desechos médicos de los entornos hospitalarios, podrían determinar el grado de contaminación microbiana, así como la aparición de resistencias (Sivaraman *et al.*, 2020).

Resulta preocupante la elevada prevalencia de *E. coli* en frutas y verduras frescas (95% y 75%) (Tabla 15), ya que el consumo de alimentos frescos, principalmente crudos, puede llevar no sólo a la exposición a microorganismos, sino al contacto con bacterias resistentes a antimicrobianos, con el consiguiente peligro para el consumidor (van Hoek *et al.*, 2015; Hölzel *et al.*, 2018), aunque no se ha detectado en nuestro trabajo ninguna cepa productora de BLEE.

5.3 *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

Campylobacter spp. son microorganismos de distribución mundial, y la causa más común de gastroenteritis notificada en los países desarrollados, alrededor del 5-14% de los casos, y la zoonosis más frecuente en la UE, siendo la carne de pollo mayoritariamente la responsable de estas infecciones (EFSA, 2021; Romdhane *et al.*, 2021).

En nuestro estudio, realizado entre los años 2016 y 2017, se analizaron cuatrocientas ochenta y tres muestras aisladas de pollos, tanto de mataderos (canal y piel de cuello), como del punto de venta (embalaje y pollo de engorde), para la detección de este género de microorganismos, arrojando una positividad que pasa del 19,8% en 2016 a un 41,9% en 2017 (Tabla 28).

El MAPAMA (2018) y el MAPA (2019) señalan que la incidencia del microorganismo en las muestras de pollo en nuestro país alcanzó un alrededor de un 66% en los dos años estudiados. Estos datos señalan una tasa de contaminación mayor que la obtenida en nuestro estudio, cuyos resultados también difieren en 2016 de los descritos a nivel de la UE (EFSA-ECDC, 2017b, 2018b), donde el mayor porcentaje se observó en la carne fresca de pollos de engorde, con alrededor de un 37% en los dos años analizados, pero

con enormes diferencias en relación con los datos aportados por los diferentes países de la UE. Esta discrepancia en los resultados obtenidos se debe a varias causas, entre las que se incluyen el bajo volumen de datos informados por los distintos Estados Miembros de la UE, y el hecho de que las normas de muestreo y presentación de informes no estén armonizadas, lo que impide realizar análisis de tendencias o comparativas entre diferentes estudios (Boelaert *et al.*, 2016; Alter y Reich, 2021).

Las muestras utilizadas en nuestro estudio para el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* proceden de pollo, obtenidas en dos puntos diferentes de la cadena alimentaria, por una parte, en matadero (canal y piel de cuello) y por otra, en el punto de venta (pollo de engorde y embalaje). Se debe considerar que en el caso de *Campylobacter* spp., la contaminación de los pollos está fuertemente influenciada por la manipulación, existiendo varios puntos críticos en el procesamiento, entre los que destaca la evisceración en el matadero, pero sin olvidar la manipulación posterior del alimento hasta alcanzar el punto de venta. Diversos autores (Figueroa *et al.*, 2009; Rasschaert *et al.*, 2020) convienen en que las canales de aves de corral contaminadas pueden aumentar significativamente después de la evisceración, pudiendo alcanzarse hasta un 90% de canales positivas para *Campylobacter* spp. Alter y Reich (2021), no sólo se centran en la manipulación de los pollos en el matadero, sino que señalan también como puntos críticos la carga y el transporte y su posterior procesamiento y conservación, sin olvidarse de la estacionalidad.

Los diferentes resultados obtenidos en los años 2016 y 2017 en cuanto a prevalencia de la contaminación en muestras de matadero y punto de venta podrían ser explicadas en parte, por la diferencia importante en el número de muestras analizadas de cada tipo, y además se debería tener en consideración la granja de origen de cada una de las muestras.

Perez-Arnedo y Gonzalez-Fandos (2017) realizaron un estudio sobre la incidencia de *Campylobacter* spp. en aves de corral en tres granjas españolas, un matadero y una planta de procesamiento. A pesar de que la prevalencia del microorganismo en pollos (ciego) en las granjas presento diferencias significativas, variando entre un 0% y un 100%, según la edad de los animales y la granja de origen, los resultados en canal de pollo (matadero) indican que el 80% de muestras procedentes de una de las granjas y el 100% de las muestras procedentes de las otras dos granjas eran portadoras del microorganismo. Lo mismo ocurría con las muestras obtenidas en la planta de procesamiento, que presentaron una contaminación del 73% en el primero de los casos y del 100% en los otros dos. El hecho de que la tasa de *Campylobacter* spp. fuera mayor en canales que en ciegos, apoya la idea de que la contaminación cruzada puede ocurrir durante el sacrificio y el procesamiento posterior, y que la utilización de equipos, superficies de trabajo, agua de proceso y aire contaminados aumenta la probabilidad de contaminación de la canal, tal y como también apuntan en su trabajo Stella *et al.* (2017) y que explicaría la diferencia entre los resultados obtenidos en distintos estudios.

En una revisión bibliográfica realizada entre los años 2006 y 2016 sobre la contaminación por este tipo de microorganismos de la carne de aves de corral al por menor en Europa realizada por Osimani *et al.* (2017), se describe que en la mayoría de los artículos analizados se reporta que, entre las muestras positivas, las frecuencias de detección de *C. jejuni* estuvieron comprendidas entre el 46.5% y el 91.4%, lo que confirma claramente a esta especie como la más relevante en la contaminación de la carne de aves de corral al por menor, mientras que la incidencia de *C. coli* se encontró en un grado claramente menor, entre un 6% y un 37%. También otros autores señalan a *C. jejuni* como la especie mayormente aislada en aves de corral, y, además, la responsable del

mayor número de casos de gastroenteritis en los últimos años. (Zbrun *et al.*, 2020; EFSA-ECDC, 2021) Los resultados obtenidos en nuestro trabajo se encuentran en consonancia con esta recopilación de datos, ya que es *C. jejuni* la especie dominante (78,1-84,2%), mientras que *C. coli* tan solo alcanza una incidencia de 15,7-21,8% (Tabla 29).

El porcentaje de contaminación del embalaje exterior de los pollos limpios alcanzó el 100% en los dos años estudiados (Tabla 32). Chrystal *et al* (2008), señalaron el potencial que tienen los embalajes de pollo como vehículos en la contaminación cruzada de alimentos, y como ruta de transmisión de *Campylobacter* spp. a los manipuladores de estos pollos envasados. En EEUU se detectó un 6,5% de las muestras de envases de pollos enteros contaminada (Elson *et al.*, 2004). Además, estos autores informaron de niveles de contaminación significativamente más altos para los despojos de pollo (8%) y aves enteras (6,5%) que para las porciones (2,3%). La Food Standars Agency del Reino Unido, realizó un estudio para examinar los niveles de contaminación por *Campylobacter* en más de tres mil muestras de pollos enteros frescos refrigerados y en sus envases, comprados en grandes superficies y en pequeñas tiendas y carnicerías. Los resultados indicaron que, dependiendo del establecimiento, la contaminación de los envases con *Campylobacter* oscilaba entre menos de un 1% hasta un 20%, con una media del 7-8% (EFSA, 2017). Se podría explicar el alto porcentaje de contaminación encontrado en nuestro estudio, si tenemos en cuenta el bajo número de muestras analizado (Tabla 32) y la técnica de aislamiento utilizada, ya que si la contaminación es baja el resultado dependerá de la sensibilidad del método de aislamiento (Wong *et al.*, 2004).

Tanto en la UE como en España, durante 2016 se determinó la resistencia antimicrobiana tanto en *C. jejuni* como en *C. coli*, a partir de muestras de canales de pollos como de pollo de engorde, de forma aleatoria, obteniendo

elevados porcentajes de resistencia frente al ciprofloxacino (65-67%), el ácido nalidíxico (62-63%) y la tetraciclina (40-51%), mientras que la eritromicina (1,3%), la estreptomina (6,1%) y la gentamicina (0,1%) fueron de bajas a muy bajas (EFSA-ECDC, 2017^a; MAPAMA, 2018). La aparición general de resistencias combinadas a los antimicrobianos de importancia crítica, ciprofloxacino y eritromicina, en *C. jejuni* se evaluó al 1,2%. Sin embargo, en el año 2017 los controles oficiales sólo recogieron datos sobre resistencias de cepas obtenidas de cerdos de engorde y bovinos menores de un año. Aunque los datos no son susceptibles de comparación con nuestro trabajo, dada la diferente procedencia de las muestras, resulta interesante el hecho de que destaquen los elevados porcentajes de resistencia encontrados frente al ciprofloxacino, ácido nalidíxico y tetraciclina (Tabla 35).

El porcentaje de resistencias encontrado en este género de microorganismos en nuestro trabajo es ligeramente superior al reportado por los organismos oficiales, aunque se mantiene el tipo de antimicrobianos a los que son resistentes los microorganismos, alcanzando porcentajes superiores al 90% de resistencia a las quinolonas y algo menor a la tetraciclina en las dos especies (Figura 11). La resistencia a la estreptomina, eritromicina y gentamicina se situó entre moderada y baja en *C. coli*, mientras que en *C. jejuni* los niveles de resistencia fueron muy bajos (Figura 11). Además, el 98% de las cepas estudiadas, presentaron resistencia al menos a una clase de antibióticos (Tabla 35).

Durante las últimas dos décadas se ha producido un aumento rápido del porcentaje de resistencia a las quinolonas, principalmente al ciprofloxacino, en todo el mundo. Según datos de la EFSA-ECDC, el 61% de las cepas aisladas de *C. jejuni* y el 71% de *C. coli* de casos clínicos en humanos en la UE, fueron resistentes a ciprofloxacino (EFSA-ECDC, 2017^a). Algunos estudios han vinculado este aumento de la resistencia con el uso de estos

antimicrobianos en animales destinados al consumo humano, especialmente en la industria avícola, considerando que se trata de un grave problema de salud pública, ya que se estima que hasta un 30% de las infecciones por *Campylobacter* en humanos se atribuyen al manejo y/o consumo de este tipo de muestras/alimentos (García-Migura *et al.*, 2014; EFSA-ECDC, 2017^a). En países donde no se permite el uso de quinolonas en la producción avícola, como Dinamarca, Finlandia y Suecia, se han aislado pocas cepas resistentes de *Campylobacter* de pollos o seres humanos (EFSA-ECDC, 2017^a).

En relación con las resistencias a las quinolonas, la EFSA-ECDC (2017^a) informó que en España se encontró una situación alarmante, ya que la tasa de resistencia detectada era del 88%, equiparable con nuestros resultados. Sin embargo, aunque estos niveles de resistencia son equiparables con los obtenidos por otros estudios recientes en otros países de la UE (Di Giannatale *et al.*, 2019; Marotta *et al.*, 2019), los resultados del conjunto de los Estados Miembro de la UE arrojan una tasa considerablemente menor (EFSA, 2017b), aduciendo dicho organismo que, en Europa, la incidencia de resistencia a las quinolonas en los pollos de engorde es muy variable, oscilando entre el 8%-10% en Finlandia y Noruega y el 95% en Letonia.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que los aislados de *C. coli* presentaban mayor nivel de resistencia a la eritromicina que los procedentes de *C. jejuni* (Figura 11). Estos datos están de acuerdo con los reportados por Pergola *et al.* (2017) en Italia, que observaron diferencias en la resistencia a este antimicrobiano entre *C. coli* y *C. jejuni*, siendo esta última especie generalmente más susceptible. Además, en los últimos años, se ha descrito un aumento en las resistencias a la eritromicina, especialmente en aislados de *C. coli*, a partir de animales en algunas regiones del mundo (Florez-Cuadrado *et al.*, 2018). En cuanto a la resistencia a la eritromicina en aislados clínicos en

la UE, los porcentajes detectados para *C. jejuni* son bajos (1,5%) y moderadamente altos para *C. coli* (14,4%) (EFSA, 2017^a).

Además, la alta sensibilidad de los aislamientos de *C. coli* y de *C. jejuni* a la gentamicina podría explicarse por el uso poco frecuente de este antibiótico como agente terapéutico tanto en humanos como en la producción de pollos de engorde, y sugiere el uso de gentamicina como fármaco alternativo para la campilobacteriosis, para reemplazar a los antibióticos para los que desarrolla resistencia con frecuencia (quinolonas y fluoroquinolonas) o con menor facilidad (eritromicina) en Bélgica (EFSA-ECDC, 2017^a). Sin embargo, algunos autores apuntan a un incremento en las resistencias a este antibiótico, sugiriendo que el pollo es una fuente potencial de infecciones por *C. coli* resistentes a la gentamicina, probablemente como resultado de la transferencia horizontal de genes de otros microorganismos (Zhao *et al.*, 2015; EFSA-ECDC, 2020).

La resistencia combinada a ciprofloxacino, ácido nalidíxico y tetraciclina, en ambas especies se situó alrededor del 39% en *C. coli* y del 71% en *C. jejuni*, superior en el caso de esta última especie a lo descrito por otros autores y que demuestra la gravedad del problema relacionado con el aumento de la resistencia a los antimicrobianos en los microorganismos, particularmente en nuestro país (Marotta *et al.*, 2019; Elhadidy *et al.*, 2019).

La corresponsencia a ciprofloxacino y eritromicina, en *C. jejuni* fue de un 1% mientras que en *C. coli* alcanzó el 13%, tasa en el caso de *C. coli* superior a la descrita para ese año en la UE. Esta resistencia combinada es de gran importancia para la salud pública, ya que ambos compuestos están categorizados según la OMS como *antimicrobianos prioritarios de importancia crítica* para el tratamiento de las infecciones por *Campylobacter* en humanos (EFSA-ECDC, 2017^a).

En relación con las cepas que presentaron multirresistencia, esta alcanzó tasas más altas en *C. coli* que en *C. jejuni*, siendo el patrón correspondiente a ciprofloxacino/ácido nalidíxico/estreptomicina/ tetraciclina el detectado con mayor frecuencia (Tabla 35), resultados similares a los descritos por otros autores (Elhadidy *et al.*, 2019).

Pese a todo, es difícil encontrar en la literatura estudios similares que nos permitan comparar los resultados. El hecho de encontrarnos con estudios realizados en diferentes países, con distinto control de antimicrobianos, diferentes tipos de muestras, con distintos antibióticos ensayados y, en muchos casos con la aplicación de distintos parámetros de multirresistencia, imposibilita contrastar los datos obtenidos (McCrackin *et al.*, 2016), aunque sí que podemos confirmar, que en nuestro país, el porcentaje de resistencias encontrado en este género de microorganismos es alto, con una alta incidencia en tetraciclinas y quinolonas, y además, con altos niveles de multirresistencia. Datos generales, que son confirmados por otros estudios relativamente similares (EFSA-ECDC, 2017^a; Marín *et al.*, 2020).

5.4 *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

Los microorganismos del género *Enterococcus* se utilizan como bacterias indicadoras de contaminación fecal y se caracterizan por su facilidad para adquirir genes de resistencia. Permiten monitorizar la presencia de marcadores de resistencia en aguas y alimentos, siendo buenos marcadores para relacionar los niveles de resistencia a los antimicrobianos y el uso de los mismos. Sin embargo, la investigación en cuanto a la presencia de este tipo de microorganismos, así como de las resistencias asociadas, es muy limitada en ambientes acuáticos, y podría deberse a que las concentraciones de antibióticos en estos ambientes son naturalmente bajas, lo que lleva a que la

mayoría de los estudios se centren en el punto de descarga de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Nnadozie *et al.*, 2019).

En nuestro estudio se han observado diferencias en la frecuencia de aislamiento de *E. faecium* y *E. faecalis* entre los distintos tipos de aguas analizadas, siendo *E. faecium* la especie preponderante (Tabla 37). Sin embargo, se debería tener en cuenta, al considerar la contaminación de las aguas según su origen, la diferenciación entre no tratadas, tanto superficiales como subterráneas y aguas de la red pública de abastecimiento.

Ciñéndonos a las aguas de entornos naturales, superficiales y subterráneas, diversos trabajos en Francia y Polonia (Luczkiewicz *et al.* 2010; Leclercq *et al.* 2013) indican que *E. faecium* suele ser la especie aislada más común. Por el contrario, otros autores han señalado que la especie de enterococos predominante en Portugal e Italia es *E. faecalis* (De Niederhäusern *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2014). Cho *et al.* (2020a) indican que la prevalencia de una u otra especie en las aguas superficiales y profundas está sujeta a cambios puntuales y no puntuales (escorrentías agrícolas, rutas de aguas pluviales), y también a influencias estacionales como la temperatura del agua y la pluviometría. Sin embargo, también se ha descrito que *E. faecalis* o *E. faecium* suelen ser las especies dominantes, no sólo en aguas superficiales, sino igualmente en otras aguas ambientales, y han sido definidas como las más resistentes al estrés causado por las condiciones ambientales y, por lo tanto, pueden sobrevivir más tiempo en entornos hostiles, como el agua, donde los nutrientes son escasos (De Niederhäusern *et al.*, 2013).

Por otra parte, a pesar de que podamos considerar que el agua procedente de una red pública de distribución debería estar libre de microorganismos, nuestros resultados no corroboran esta premisa, ya que seis muestras de este origen han arrojado resultados positivos en cuanto a la presencia de las dos

especies de enterococos (Tabla 38). Las redes públicas de distribución de agua se rigen por normativas, que pueden variar entre países y regiones, y que deben incluir pautas basadas en la salud establecidas por las autoridades sanitarias competentes para gestionar adecuadamente, entre otros, la calidad microbiológica del agua. Sin embargo, el agua pasa por sistemas y tuberías de distribución masiva que, si no se tratan adecuadamente, pueden estar contaminados con diversos microorganismos y provocar algunos efectos graves para la salud (Ibekwe *et al.*, 2019).

En un estudio para determinar la calidad del agua en cuatro plantas de distribución en California, Florida, Massachusetts y Nueva York, con diferentes procesos de tratamiento, se detectaron bacterias indicadoras (entre ellas *Enterococcus* spp.) en el efluente de un solo sistema, pero no detectándose en los puntos de muestreo, lo que sugería que la tasa de supervivencia de los microorganismos era baja. No obstante, aunque todos los procedimientos de tratamiento reducen los niveles de bacterias en el efluente, estas podrán multiplicarse en los sistemas de depósito y distribución si se produce la pérdida de desinfectante residual (Falkinham *et al.*, 2015). Todos esto, explicaría la contaminación encontrada en este tipo de aguas en nuestro trabajo.

E. faecium presento un nivel medio de resistencia a quinupristin/dalfopristin y baja o muy baja a daptomicina, vancomicina, eritromicina, tetraciclina y tigeciclina. Por el contrario, en *E. faecalis*, la mayor tasa de resistencia fue a la tetraciclina, niveles medios para quinupristin/dalfopristin, tigeciclina y eritromicina y bajos para cloranfenicol, ciprofloxacino, gentamicina y vancomicina (Figura 13). Resultados que están en consonancia con varios estudios que han demostrado que los enterococos en el agua ambiental son resistentes a una amplia gama de antimicrobianos en mayor o menor medida, que abarca los utilizados en este trabajo, (Nnadozie *et al.*, 2019; Cho *et al.*,

2020b) y que corroboran nuestros resultados. La incidencia varía con el área geográfica en estudio, siendo probable que se deba al tipo de fuente contaminante (Cho *et al.*, 2020b).

Especial importancia presenta actualmente la resistencia detectada a la vancomicina en ambas especies, ya que no es frecuente en ambientes acuáticos, habiéndose sugerido que su origen está relacionado con la descarga de aguas residuales procedentes de hospitales, considerándose un nivel de amenaza grave por parte del ECDC ya que solo existen unos pocos antimicrobianos (linezolid, quinupristin/dalfopristin, daptomicina y tigeciclina) disponibles para el tratamiento de estas infecciones, pero desafortunadamente, la resistencia a estos antimicrobianos también está aumentando (EFSA-ECDC, 2019a; Cho *et al.*, 2020b), y que se ve reflejada en los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En relación con la multiresistencia en ambas especies, se han detectado cuatro patrones diferentes, a tres, cuatro o cinco familias de antimicrobianos y, con una tasa muy baja para cada uno de ellos, ya que sólo detectamos una cepa para cada patrón. La resistencia a quinupristin/dalfopristin, se presentó en tres de los cinco patrones, y la vancomicina tan solo apareció en uno (Tabla 44). Resulta complicado realizar una comparación directa de los patrones de multiresistencia con otros estudios, debido en parte las diferencias en los antimicrobianos probados, así como a los métodos utilizados para su detección.

6. CONCLUSIONES

6 Conclusiones

1. La mayor tasa de prevalencia de *Salmonella* spp. se encontró en los alimentos de origen cárnico, presentando estos aislados elevada resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina y en menor medida a las quinolonas, altamente relacionadas con el origen de la muestra, siendo una consecuencia indeseable del uso de antimicrobianos en animales destinados a la alimentación.

2. Los niveles de multirresistencia encontrados en los aislados de *Salmonella* fueron elevados, presentando alguno de ellos resistencias a cuatro y cinco familias de antimicrobianos. Se detectaron diferentes patrones, estando siempre implicada la ampicilina y en un porcentaje muy alto las quinolonas, consideradas como tratamiento de primera línea en salmonelosis en humanos.

3. *Escherichia coli* estuvo presente en el 4% de las muestras analizadas, hallando la mayor incidencia en frutas y hortalizas frescas, seguida de moluscos. Los microorganismos procedentes de frutas y verduras frescas presentaron resistencia moderada a la ampicilina y al trimetoprim, mientras que en los procedentes de moluscos se encontraron resistencias de moderadas a bajas a casi todos los antimicrobianos.

4. Los aislados de *E. coli* mostraron multirresistencia en un porcentaje alto, llegando alguno de los aislados a presentar resistencia a seis o siete familias de antimicrobianos, en su mayoría procedentes de moluscos y en dos casos de productos lácteos. Los patrones fueron muy variados, formando parte de ellos, en una proporción muy elevada, la ampicilina y la tetraciclina. Alguno de los aislados eran productores de betalactamasas de espectro extendido y de tipo AmpC.

5. *Campylobacter jejuni* presentó una prevalencia superior a *C. coli* en los alimentos analizados, con mayor incidencia en el punto de venta, lo que indicaría el importante papel que jugaría la manipulación y la contaminación cruzada de estos alimentos. Casi todos los aislados de *Campylobacter* fueron resistentes al menos a un antimicrobiano, siendo los patrones de resistencia similares para los diferentes tipos de muestras, sugiriendo que estas resistencias ya se encontraban presentes en las primeras etapas de la cadena alimentaria.

6. La prevalencia de aislados multirresistentes fue mayor en *C. coli* que en *C. jejuni*, destacando que tres de los aislados fueron resistentes a todos los antimicrobianos probados, lo cual tiene no solo importancia epidemiológica, sino que representan una seria preocupación para la salud humana, al ser resistentes a todos o casi todos los agentes usados comúnmente para tratar la campilobacteriosis en humanos.

7. Los distintos tipos de aguas analizadas, incluyendo las de la red pública presentaron contaminación, observando diferencias en la frecuencia de aislamiento de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis*, y siendo *E. faecium* la especie preponderante.

8. *E. faecium* y *E. faecalis* presentaron diferentes tasas de resistencia a diferentes antimicrobianos, no existiendo diferencias significativas entre la resistencia a los diferentes antibióticos y el origen de la muestra. La resistencia detectada a la vancomicina es importante, ya que solo existen unos pocos antimicrobianos disponibles para el tratamiento de estas infecciones. Sólo unos pocos aislados presentaron multirresistencia, con diferente patrón para cada uno de ellos.

9. De acuerdo con los resultados obtenidos, se debe promover y reforzar el uso prudente de antibióticos bajo la supervisión de expertos. En lugar de

actuar como un sistema *amplificador de resistencias a antimicrobianos*, proponemos que la cadena alimentaria podría actuar como un *modulador de resistencias* para reducir la prevalencia de microorganismos resistentes mediante el control cuidadoso de la misma.

7. BIBLIOGRAFÍA

7 Bibliografía.

- Aarts H, Margolles A. Antibiotic resistance genes in food and gut (non-pathogenic) bacteria. Bad genes in good bugs. *Front Microbiol.* 2015 Jan 9; 5:754. doi: 10.3389/fmicb.2014.00754.
- Aenishaenslin C, Häsler B, Ravel A, Parmley EJ, Mediouni S, Bennani H, Stärk KDC, Buckering DL. Evaluating the integration of One Health in surveillance systems for antimicrobial use and resistance: a conceptual framework. *Front Vet Sci.* 2021; 8:611931. doi: 10.3389/fvets.2021.611931
- AESAN. Informe análisis de datos de zoonosis 2019. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/control_oficial/2019_Informe_AESAN_Analisis_Datos_
- Ahmad A, Dada AC, Usup G, Heng LY. Occurrence of *Enterococcus* species with virulence markers in an urban flow-influenced tropical recreational beach. *Mar Pollut Bull.* 2014 May 15;82(1-2):26-38. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.03.028.
- Alcalde-Rico M, Hernando-Amado S, Blanco P, Martínez JL. Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. *Front Microbiol.* 2016; 21(7):1483. doi: 10.3389/fmicb.2016.01483
- Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 2007; 128(6):1037-1050. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.004.
- Alós JI. Antibiotic resistance: a global crisis. *Enferm Infecc y Microbiol Clin.* 2015; 33(10):692-699. doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.004.
- Alter T, Reich F. Management strategies for prevention of *Campylobacter* infections through the poultry food chain: a European perspective. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2021; 431:79-102. doi: 10.1007/978-3-030-65481-8_4.
- Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol.* 2009; 11:2970-2988. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01972. x.
- Baker KS, Burnett E, McGregor H, Deheer-Graham A, Boinett C, Langridge GC, Wailan AM, Cain AK, Thomson NR, Russell JE, Parkhill J. The Murray collection of pre-antibiotic era Enterobacteriaceae: a unique research resource. *Genome Med.* 2015; 7:97. doi: 10.1186/s13073-015-0222-7.
- Barrio C. Historia de la Dermatología de la Sífilis en la Historia. *Folia Dermatol.* 2000; 11(3): 22-23.
- Baudoin F, Hogeveen H, Wauters E. Reducing antimicrobial use and dependence in livestock production systems: a social and economic sciences perspective on an interdisciplinary approach. *Front Vet Sci.* 2021; 8:584593. doi: 10.3389/fvets.2021.584593

- Bennani H, Mateus A, Mays N, Eastmure E, Stärk KDC, Häslér B. Overview of evidence of antimicrobial use and antimicrobial resistance in the food chain. *Antibiotics*. 2020; 9(2):49.
- Bennett RJ, Baker KS. Looking backward to move forward: the utility of sequencing historical bacterial genomes. *J Clin Microbiol*. 2019; 57(8). doi: 10.1128/JCM.00100-19.
- Bergšpica I, Kaprou G, Alexa EA, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(10):678. doi: 10.3390/antibiotics9100678.
- Boelaert F, Amore G, Van der Stede Y, Hugas M. EU-wide monitoring of biological hazards along the food chain: achievements, challenges and EFSA vision for the future. *Curr Opin Food Sci*. 2016; 12:52-62.
- Boqvist S, Söderqvist K, Vågsholm I. Food safety challenges and One Health within Europe. *Acta Vet Scand*. 2018; 60(1):1. doi: 10.1186/s13028-017-0355-3.
- Brahmi S, Dunyach-Rémy C, Touati A, Lavigne JP. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone O25b-ST131 isolated from wild fish in Mediterranean Sea. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(3). doi: 10.1016/j.cmi.2014.09.019
- Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*. 2020; 25:1340. doi: 10.3390/molecules25061340.
- Cafini F. y Alou L. 30 de octubre de 1928, una fecha clave en el diario de Fleming. *Rev Esp Quimioterap*. 2006; 19(4):395-396.
- Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(1):44-52. doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.001.
- Campos J, Mourão J, Peixe L, Antunes P. Non-typhoidal *Salmonella* in the pig production chain: a comprehensive analysis of its impact on human health. *Pathogens*. 2019; 8(1):19. doi: 10.3390/pathogens8010019.
- Carrasco Z, Renato I, Lozano C. Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enf Inf y Microbiol*. 2017; 37(3): 95-104.
- Caruso GG. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from farm livestock and related analytical methods: A review. *J AOAC Int*. 2018; 101(4):916-922. doi: 10.5740/jaoacint.17-0445.
- Castro-Vargas RE, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: a global overview. *Vet World*. 2020; 13(10):2070-2084. doi: 10.14202/vetworld.2020.2070-2084.

- Ceccarelli D, Hesp A, van der Goot J, Joosten P, Sarrazin S, Wagenaar JA, Dewulf J, Mevius DJ, Effort Consortium OBOT. Antimicrobial resistance prevalence in commensal *Escherichia coli* from broilers, fattening turkeys, fattening pigs and veal calves in European countries and association with antimicrobial usage at country level. *J Med Microbiol.* 2020; 69(4):537-547. doi: 10.1099/jmm.0.001176.
- Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(3):827-834. doi: 10.1093/jac/dkt443.
- Chen Q, Dharmaraj T, Cai PC, Burgener EB, Haddock NL, Spakowitz AJ, Bollyky PL. Bacteriophage and Bacterial Susceptibility, Resistance, and Tolerance to Antibiotics. *Pharmaceutics.* 2022;14(7):1425. doi: 10.3390/pharmaceutics14071425.
- Chiesa LM, Nobile M, Panseri S, Arioli F. Antibiotic use in heavy pigs: Comparison between urine and muscle samples from food chain animals analysed by HPLC-MS/MS. *Food Chem.* 2017;235:111-118. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.184.
- Chlebicz A, Ślizewska K. Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review. *Int J Environ Res Public Health.* 2018; 15(5):863. doi: 10.3390/ijerph15050863.
- Cho S, Hiott LM, McDonald JM, Barrett JB, McMillan EA, House SL, Adams ES, Frye JG, Jackson CR. Diversity and antimicrobial resistance of *Enterococcus* from the Upper Oconee Watershed, Georgia. *J Appl Microbiol.* 2020a; 128(4):1221-1233. doi: 10.1111/jam.14550.
- Cho S, Jackson CR, Frye JG. The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in surface water. *Lett Appl Microbiol.* 2020b; 71(1):3-25. doi: 10.1111/lam.13301.
- Chrystal ND, Hargraves SJ, Boa AC, Ironside CJ. Counts of *Campylobacter* spp. and prevalence of *Salmonella* associated with New Zealand broiler carcasses. *J Food Prot.* 2008;71(12):2526-2532. doi: 10.4315/0362-028x-71.12.2526.
- Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS One.* 2011; 6(3). doi: 10.1371/journal.pone.0017549.
- Corredor-García D, García-Pinilla S, Blanco-Lizarazo CM. Systematic Review and Meta-analysis: *Salmonella* spp. prevalence in vegetables and fruits. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(3):47. doi: 10.1007/s11274-021-03012-7.
- Cummings KJ, Aprea VA, Altier C. Antimicrobial resistance trends among *Escherichia coli* isolates obtained from dairy cattle in the northeastern United States, 2004-2011. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; 11(1):61-67. doi: 10.1089/fpd.2013.1605.

- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011; 477(7365): 457-461. doi: 10.1038/nature10388.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74(3):417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- de Alcântara Rodrigues I, Ferrari RG, Panzenhagen PHN, Mano SB, Conte-Junior CA. Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods. *Adv Appl Microbiol*. 2020;112:143-183. doi: 10.1016/bs.aambs.2020.03.001.
- De Niederhäusern S, Bondi M, Anacarso I, Iseppi R, Sabia C, Bitonte F, Messi P. Antibiotics and heavy metals resistance and other biological characters in enterococci isolated from surface water of Monte Cotugno Lake (Italy). *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng*. 2013; 48(8):939-946. doi: 10.1080/10934529.2013.762739.
- Devleesschauwer B, Marvasi M, Giurcanu MC, Hochmuth GJ, Speybroeck N, Havelaar AH, Teplitski M. High relative humidity pre-harvest reduces post-harvest proliferation of *Salmonella* in tomatoes. *Food Microbiol*. 2017; 66:55–63. doi: 10.1016/j.fm.2017.04.003.
- Di Giannatale E, Calistri P, Di Donato G, Decastelli L, Goffredo E, Adriano D, Mancini ME, Galleggiante A, Neri D, Antoci S, Marfoglia C, Marotta F, Nuvoloni R, Migliorati G. Thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken and bovine meat in Italy: prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates. *PLoS One*. 2019; 14(12). doi: 10.1371/journal.pone.0225957.
- Dodds DR. Antibiotic resistance: a current epilogue. *Biochem Pharmacol*. 2017; 134:139-146. doi: 10.1016/j.bcp.2016.12.005.
- DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea (Decisión de ejecución de la Comisión 2013/652/UE). Decisión de ejecución de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos. 2013.
- DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea (Decisión de ejecución de la Comisión 2020/1729/UE). Decisión de ejecución de la Comisión de 17 de noviembre de 2020 relativa a la vigilancia y la notificación de la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias zoonóticas y comensales. 2020.
- ECDC-EFSA-EMA. First joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals1 Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. 2015. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/ecdc/efsa/ema-first-joint-report-integrated-analysis-consumption-antimicrobial-agents-occurrence-antimicrobial_en.pdf

- EFSA- ECDC. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* 2019a;17(12):e05926. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5926.
- EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA J.* 2007; 587:1–16.
- EFSA. The Maintenance of the List of Qps Microorganisms Intentionally Added to Food or Feed - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal* 2008;6(12):923, 12 pp. 10.2903/j.efsa.2008.923.
- EFSA_ECDC. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 2021;19(2):e06406. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406.
- EFSA-BIOHAZ. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 14: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2021. *EFSA J.* 2021;19(7):e06689. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6689.
- EFSA-ECDC. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J.* 2018a;16(2):e05182. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5182.
- EFSA-ECDC. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J.* 2020;18(3):e06007. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6007.
- EFSA-ECDC. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J.* 2019b;17(2):e05598. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598.
- EFSA-ECDC. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA J.* 2017a; 15(2). doi: 10.2903/j.efsa.2017.4694.
- EFSA-ECDC. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA J.* 2016; 14(2). doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4380>

- EFSA-ECDC. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 2017b;15(12):e05077. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5077.
- EFSA-ECDC. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA J.* 2021;19(4):e06490. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6490.
- Ehuwa O, Jaiswal AK, Jaiswal S. *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods.* 2021; 10(5):907. doi: 10.3390/foods10050907.
- Elhadidy M, Miller WG, Arguello H, Álvarez-Ordóñez A, Dierick K, Botteldoorn N. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of *Campylobacter coli* from diarrhoeal patients and broiler carcasses in Belgium. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66(1):463-475. doi: 10.1111/tbed.13046.
- Elson R, Burgess F, Little CL, Mitchell RT; Local Authorities Co-Ordinators of Regulatory Services and the Health Protection Agency. Microbiological examination of ready-to-eat cold sliced meats and pâté from catering and retail premises in the UK. *J Appl Microbiol.* 2004;96(3):499-509. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02203.x.
- EMA. European Medicines Agency. Annual Report 2019. The European Medicines Agency's contribution to science, medicines and health in 2019. 2020. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/annual-report-2019/index.html>
- Errecalde JO. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. 2004. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm#Contents>.
- Falkinham JO, Hilborn ED, Arduino MJ, Pruden A, Edwards MA. Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Health Perspect.* 2015; 123:749–758. doi: 10.1289/ehp.1408692.
- FAO, OIE, WHO. Sharing responsibilities and coordinating global activities to address health risks at the animal-human-ecosystems interfaces: a tripartite concept note. FAO 2010. https://www.who.int/influenza/resources/documents/tripartite_concept_note_hanoi/en/
- Figueroa G, Troncoso M, López C, Rivas P, Toro M. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiol.* 2009; 9:94. doi: 10.1186/1471-2180-9-94.
- Fisher JF, Mobashery S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Sci.* 2020; 29(3):629-646. doi: 10.1002/pro.3737.

- Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Pathol. 1929;10(3):226-36.
- Florez-Cuadrado D, Moreno MA, Ugarte-Ruíz M, Domínguez L. Antimicrobial resistance in the food chain in the European Union. Adv Food Nutr Res. 2018; 86:115-136. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.04.004.
- Founou LL, Founou RC, Essack SY. Antibiotic Resistance in the food chain: a developing country-perspective. Front Microbiol. 2016; 7:1881. doi: 10.3389/fmicb.2016.01881
- Frost I, Van Boeckel TP, Pires J, Craig J, Laxminarayan R. Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. J Travel Med. 2019; 26(8). doi: 10.1093/jtm/taz036.
- Ganz K, Yamamoto E, Hardie K, Hum C, Hussein H, Locas A, Steele M. Microbial safety of cheese in Canada. Int J Food Microbiol. 2020; 321:108521. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108521.
- García-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. Vet Microbiol. 2014; 170:1-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.013.
- García-Sánchez JE, García E, Lucila Merino M. Cien años de la bala mágica del Dr. Ehrlich (1909-2009). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(8): 521-533. doi: 10.1016/j.eimc.2009.07.009.
- Gray JA, Chandry PS, Kaur M, Kocharunchitt C, Bowman JP, Fox EM. Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities. Front Microbiol. 2018 Apr 3; 9:605. doi: 10.3389/fmicb.2018.00605.
- Habboush Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. StatPearls. 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature. 2007; 446(7137): 749-757. doi: 10.1038/nature05630.
- Hille K, Ruddat I, Schmid A, Hering J, Hartmann M, von Münchhausen C, Schneider B, Messelhäuser U, Friese A, Mansfeld R, Käsbohrer A, Hörmansdorfer S, Roesler U, Kreienbrock L. Cefotaxime-resistant *E. coli* in dairy and beef cattle farms—Joint analyses of two cross-sectional investigations in Germany. Prev Vet Med. 2017; 142:39-45. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.05.003.
- Hoffmann S, Scallan Walter E. Acute Complications and Sequelae from Foodborne Infections: Informing Priorities for Cost of Foodborne Illness Estimates. Foodborne Pathog Dis. 2020;17(3):172-177. doi: 10.1089/fpd.2019.2664. doi: 10.1089/fpd.2019.2664.

- Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJ. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016; 387(10014):176-187. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- Hölzel CS, Tetens JL, Schwaiger K. Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: a need for quantitative risk assessment. *Foodborne Pathog Dis*. 2018; 15(11):671-688. doi: 10.1089/fpd.2018.2501.
- Hudson JA, Frewer LJ, Jones G, Brereton PA, Whittingham MJ, Stewart G. The agri-food chain and antimicrobial resistance: a review. *Trends Food Sci Technol*. 2017; 69:131–147.
- Hutchings M, Truman A, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019; 51:72-80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008
- Ibekwe AM, Murinda SE. Linking microbial community composition in treated wastewater with water quality in distribution systems and subsequent health effects. *Microorganisms*. 2019; 7(12):660. doi: 10.3390/microorganisms7120660.
- Iranzo M, Gamón M, Boluda R, Mormeneo S. Analysis of pharmaceutical biodegradation of WWTP sludge using composting and identification of certain microorganisms involved in the process. *Sci Total Environ*. 2018; 1;640-641:840-848. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.366.
- Iwu CD, Korsten L, Okoh AI. The incidence of antibiotic resistance within and beyond the agricultural ecosystem: a concern for public health. *Microbiologyopen*. 2020; 9(9):e1035. doi: 10.1002/mbo3.1035. Epub 2020 Jul 25.
- Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*. 2019; 12(4):504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521
- JACRA-ES. Primer análisis integrado del consume de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. Plan nacional de Resistencia a antibióticos. 2017. https://resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0
- Kohli I, Joshi NC, Mohapatra S, Varma A. Extremophile – an adaptive strategy for extreme conditions and applications. *Curr Genomics*. 2020; 21(2):96-110. doi: 10.2174/1389202921666200401105908.
- Kovačević Z, Vidović J, Erdeljan M, Cincović M, Ružić Z, Galić I, Kukurić T, Stojanac N, Horvat O. Veterinary Practitioners' Standpoints and Comprehension towards Antimicrobial Use-Are There Opportunities for Antimicrobial Stewardship Improvement? *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(7):867. doi: 10.3390/antibiotics11070867.

- Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol.* 1983;46(1):165-70. doi: 10.1128/aem.46.1.165-170.1983.
- Lai CKC, Ng RWY, Leung SSY, Hui M, Ip M. Overcoming the rising incidence and evolving mechanisms of antibiotic resistance by novel drug delivery approaches - An overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022; 181:114078. doi: 10.1016/j.addr.2021.114078.
- Lamon S, Piras F, Meloni D, Agus V, Porcheddu G, Pes M, Cambula MG, Esposito G, Fois F, Consolati SG, Mureddu A. Enumeration of *Escherichia coli* and determination of *Salmonella* spp. and verotoxinogenic *Escherichia coli* in shellfish (*Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*) harvested in Sardinia, Italy. *Ital J Food Saf.* 2020 ;9(4):195-200. doi: 10.4081/ijfs.2020.8625.
- Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):257-269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.
- Leclercq R, Oberlé K, Galopin S, Cattoir V, Budzinski H, Petit F. Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river Continuum. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(7):2428-2434. doi: 10.1128/AEM.03586-12.
- Lees P, Pelligand L, Giraud E, Toutain PL. A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution. *J Vet Pharmacol Ther.* 2020; 44(2):137-171. doi: 10.1111/jvp.12895.
- Leisner JJ. The Diverse Search for Synthetic, Semisynthetic and Natural Product Antibiotics From the 1940s and Up to 1960 Exemplified by a Small Pharmaceutical Player. *Front Microbiol.* 2020;11:976. doi: 10.3389/fmicb.2020.00976.
- Lenzi A, Marvasi M, Baldi A. Agronomic practices to limit pre-and post-harvest contamination and proliferation of human pathogenic Enterobacteriaceae in vegetable produce. *Food Cont.* 2020. 119(2):107486. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107486
- Lima LM, Silva BNM da, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem.* 2020; 208:112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829.
- Liu Y, Tong Z, Shi J, Jia Y, Yang K, Wang Z. Correlation between exogenous compounds and the horizontal transfer of plasmid-borne antibiotic resistance genes. *Microorganisms.* 2020; 8(8):1211. doi: 10.3390/microorganisms8081211.
- Łuczkiwicz A, Jankowska K, Kurlenda J, Olańczuk-Neyman K. Identification, and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Sci Technol.* 2010; 62(2):466-473 doi: 10.2166/wst.2010.909.

- Machado Junior PC, Chung C, Hagerman A. Modeling *Salmonella* spread in broiler production: identifying determinants and control strategies. *Front Vet Sci* 2020; 7:564. doi: 10.3389/fvets.2020.00564.
- MacNair CR, Brown ED. Outer Membrane Disruption Overcomes Intrinsic, Acquired, and Spontaneous Antibiotic Resistance. *mBio*. 2020 Sep 22;11(5):e01615-20. doi: 10.1128/mBio.01615-20.
- Mała L, Popowska M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2016; 67(4):343-358.
- Makary MA, Kaczmarek K, Nachman K. A call for doctors to recommend antibiotic-free foods: agricultural antibiotics and the public health crisis of antimicrobial resistance. *J Antibiot (Tokyo)*. 2018; 71(8):685-687. doi: 10.1038/s41429-018-0062-y.
- Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*. 2018; 23(4):795. doi: 10.3390/molecules23040795.
- MAPA. Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación. Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas 2017. 2019. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/inf_zoonosis_2019_web_final_tcm30-582640.pdf
- MAPA. Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación. Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas 2019. 2021. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/inf_zoonosis_2019_web_final_tcm30-582640.pdf
- MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación y Medio Ambiente. Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas 2014. 2017a. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/afinforme-zoonosis-2014_tcm30-419936.pdf
- MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación y Medio Ambiente. Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas 2015. 2017b. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informe_efs_a_zoonosis_ram_2015_tcm30-434242.pdf
- MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación y Medio Ambiente. Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas 2016. 2018. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informe_web_final_zoonosis_2018_tcm30-543744.pdf
- Marín C, Sevilla-Navarro S, Lonjedo R, Catalá-Gregori P, Ferrús MA, Vega S, Jiménez-Belenguer A. Genotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in thermophilic *Campylobacter* isolated from poultry breeders and their progeny in Eastern Spain. *Poult Sci*. 2020; 99(10):5096-5104. doi: 10.1016/j.psj.2020.06.043.

- Marotta F, Garofolo G, di Marcantonio L, Di Serafino G, Neri D, Romantini R, Sacchini L, Alessiani A, Di Donato G, Nuvoloni R, Janowicz A, Di Giannatale E. Antimicrobial resistance genotypes and phenotypes of *Campylobacter jejuni* isolated in Italy from humans, birds from wild and urban habitats, and poultry. *PLoS One*. 2019 Oct 11;14(10):e0223804. doi: 10.1371/journal.pone.0223804. Erratum in: *PLoS One*. 2019 Nov 7;14(11):e0225231.
- Martínez-Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(4):4-9. doi: 10.1016/S0213-005X(10)70035-5.
- Mattia A, Merker R. Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: premarket approval or «generally recognized as safe» notification. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (2):115-118. doi: 10.1086/523329.
- McCrackin MA, Helke KL, Galloway AM, Poole AZ, Salgado CD, Marriott BP. Effect of Antimicrobial Use in Agricultural Animals on Drug-resistant Foodborne *Campylobacteriosis* in Humans: A Systematic Literature Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(13):2115-32. doi: 10.1080/10408398.2015.1119798.
- Merrikh H, Kohli RM. Targeting evolution to inhibit antibiotic resistance. *FEBS J*. 2020; 287(20):4341-4353. doi: 10.1111/febs.15370.
- Miyachiro MM, Contreras-Martel C, Dessen A. penicillin-binding proteins (PBPs) and bacterial cell wall elongation complexes. *Subcell Biochem*. 2019; 93:273-289. doi: 10.1007/978-3-030-28151-9_8.
- Moore PR, Evenson A. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J Biol Chem*. 1946;165(2):437-441.
- Morel CM, Lindahl O, Harbarth S, de Kraker MEA, Edwards S, Hollis A. Industry incentives and antibiotic resistance: an introduction to the antibiotic susceptibility bonus. *J Antibiot (Tokyo)*. 2020; 73(7):421-428. doi: 10.1038/s41429-020-0300-y.
- Myrenås M, Slette-meås JS, Thorsteinsdóttir TR, Bengtsson B, Börjesson S, Nilsson O, Landén A, Sunde M. Clonal spread of *Escherichia coli* resistant to cephalosporins and quinolones in the Nordic broiler production. *Vet Microbiol*. 2018; 213:123-128. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.015
- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos [Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(7):524-34. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.011.
- Niero G, Bortolaia V, Vanni M, Intorre L, Guardabassi L, Piccirillo A. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. *Vet Microbiol*. 2018; 216:93-98. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.02.012

- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(4):593-656. doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
- Nnadozie CF, Odume ON. Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ Pollut.* 2019; 254(Pt B):113067. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113067.
- Novais C, Freitas AR. Transmission of antibiotic resistant bacteria and genes: unveiling the jigsaw pieces of a one health problem. *Pathogens.* 2020; 9(6):497. doi: 10.3390/pathogens9060497.
- OMS. Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. 2015
- OMS. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. [WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics](http://www.who.int/publications/m/item/global-priority-list-of-antibiotic-resistant-bacteria-to-guide-research-discovery-and-development-of-new-antibiotics)
- Osimani A, Aquilanti L, Pasquini M, Clementi F. Prevalence, and risk factors for thermotolerant species of *Campylobacter* in poultry meat at retail in Europe. *Poult Sci.* 2017; 96(9): 3382-3391. doi: 10.3382/ps/pex143.
- Patel SJ, Wellington M, Shah RM, Ferreira MJ. Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. *Clin Ther.* 2020; 42(9):1649-1658. doi: 10.1016/j.clinthera.2020.07.004.
- PEI.: Paul-Ehrlich-Institut. 2005. Disponible en: <http://www.pei.de/EN/institute/paul-ehrlich/publications/publications-of-paul-ehrlich-node.html>
- Pérez Pulido R, Grande Burgos MJ, Gálvez A, Lucas López R. Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria. *Crit Rev Biotechnol.* 2016; 36(5): 851-861. doi: 10.3109/07388551.2015.1049935.
- Perez-Arnedo I, Gonzalez-Fandos E. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry in three spanish farms, a slaughterhouse, and a further processing plant. *Foods.* 2019; 8(3):111. doi: 10.3390/foods8030111.
- Pergola S, Franciosini MP, Comitini F, Ciani M, De Luca S, Bellucci S, *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. *J Appl Microbiol.* 2017; 122(5):1348-1356. doi: 10.1111/jam.13419
- Peruzu MF, Capuano F, Proroga YTR, Cristiano D, Carullo MR, Murru N. Antimicrobial susceptibility testing for *Salmonella* serovars isolated from food samples: five-year monitoring (2015–2019). *Antibiotics.* 2020; 9(7):1-17. doi: 10.3390/antibiotics9070365.

- Pesciaroli M, Magistrali CF, Filippini G, Epifanio EM, Lovito C, Marchi L, Maresca C, Massacci FR, Orsini S, Scoccia E, Tofani S, Pezzotti G. Antibiotic-resistant commensal *Escherichia coli* are less frequently isolated from poultry raised using non-conventional management systems than from conventional broiler. *Int J Food Microbiol.* 2020; 314:108391. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108391.
- Plassard V, Gisbert P, Granier SA, Millemann Y. Surveillance of Extended-Spectrum β -Lactamase-, Cephalosporinase- and Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Raw Milk Filters and Healthy Dairy Cattle in Three Farms in Île-de-France, France. *Front Vet Sci.* 2021;8:633598. doi: 10.3389/fvets.2021.633598.
- Polianciuc SI, Gurzău AE, Kiss B, Georgia Ștefan M, Loghin F. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med Pharm Reports.* 2020; 93(3):231-240. doi: 10.15386/mpr-1742.
- Polo AB, Fabri RL, Apolônio ACM. Searching for mechanisms of action of antimicrobials. *Arch Microbiol.* 2020; 202(9):2347-2354. doi: 10.1007/s00203-020-01959-z.
- Radakovic, M. International 58th Meat Industry Conference “Meat Safety and Quality: Where it goes?” Food safety – flexible approaches to production and official controls. *Procedia Food Sci.* 2015; (5):247-249.
- Rajaei M, Moosavy MH, Gharajalar SN, Khatibi SA. Antibiotic resistance in the pathogenic foodborne bacteria isolated from raw kebab and hamburger: phenotypic and genotypic study. *BMC Microbiol.* 2021 Oct 7;21(1):272. doi: 10.1186/s12866-021-02326-8.
- Ramos S, Silva V, de Lurdes Enes Dapkevicius M, Caniça M, Tejedor-Junco MT, Igrejas G, *et al.* *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production. *Animals.* 2020;10(12):1-15. doi: 10.3390/ani10122239.
- Ramos-Vivas J, Elexpuru-Zabaleta M, Samano ML, Barrera AP, Forbes-Hernández TY, Giampieri F, Battino M. Phages and Enzybiotics in Food Biopreservation. *Molecules.* 2021;26(17):5138. doi: 10.3390/molecules26175138.
- Rasschaert G, De Zutter L, Herman L, Heyndrickx M. *Campylobacter* contamination of broilers: the role of transport and slaughterhouse. *Int J Food Microbiol.* 2020; 322:108564. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108564.
- Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc.* 2012; 87(2):198-208. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.12.003.
- Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, Grace D, Hay SI, Jiwakanon J, Kakkar M, Kariuki S, Laxminarayan R, Lubroth J, Magnusson

- U, Thi Ngoc P, Van Boeckel TP, Woolhouse ME. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016; 110(7):377-380. doi: 10.1093/trstmh/trw048.
- Rodríguez Torrens H, Barreto Argilagos G, Sadrés Cabrera M, Bertot Valdés J, Martínez Sáez S, Guevara Viera G. Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio REDVET. *Vet.* 2015; 16 (8):1-27.
- Rodríguez-Lázaro D, Hernandez M. Emerging biological risks in a global context: an introduction. *Adv Food Nutr Res.* 2018; 86:1-12. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.04.001.
- Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303(6-7): 293-297. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.004.
- Romdhane R Ben, Merle R. The data behind risk analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2021; 431:25-58. doi: 10.1007/978-3-030-65481-8_2.
- Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig KJ. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: a global overview. *Poult Sci.* 2019; 98(4):1791-1804. doi: 10.3382/ps/pey539.
- Sarbu I, Matei C, Benea V, Georgescu SR. Brief history of syphilis. *J Med Life.* 2014; 7(1): 4-10.
- Sarno E, Pezzutto D, Rossi M, Liebana E, Rizzi V. A Review of Significant European Foodborne Outbreaks in the Last Decade. *J Food Prot.* 2021 Dec 1;84(12):2059-2070. doi: 10.4315/JFP-21-096. doi: 10.4315/JFP-21-096.
- Schwarz S, Loeffler A, Kadlec K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet Dermatol.* 2017; 28(1):82-e19. doi: 10.1111/vde.12362.
- Sellera FP, Fernandes MR, Moura Q, Carvalho MPN, Lincopan N. Extended-spectrum-B-lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in wild fishes from a polluted area in the atlantic coast of South America. *Mar Pollut Bull.* 2018; 135:183-186. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.07.012.
- Shariff M. Food safety: a linchpin of One Health. *Rev Sci Tech.* 2019 May;38(1):123-133. doi: 10.20506/rst.38.1.2947.
- Simmons, J.G. (2002). «Girolamo Fracastoro». *Doctors & Discoveries: Lives that created today's medicine.* Boston: Houghton Mifflin. ISBN 0-618-15276-8.
- Sivaraman GK, Sudha S, Muneeb KH, Shome B, Holmes M, Cole J. Molecular assessment of antimicrobial resistance and virulence in multi drug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from food

- fishes, Assam, India. *Microb Pathog.* 2020; 149:104581. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104581
- Sletteemås JS, Sunde M, Ulstad CR, Norström M, Wester AL, Urdahl AM. Occurrence and characterization of quinolone resistant *Escherichia coli* from norwegian turkey meat and complete sequence of an IncX1 plasmid encoding qnrS1. *PLoS One.* 2019; 14(3):e0212936. doi: 10.1371/journal.pone.0212936.
- Stella S, Soncini G, Ziino G, Panebianco A, Pedonese F, Nuvoloni R, Di Giannatale E, Colavita G, Alberghini L, Giaccone V. Prevalence and quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. in Italian retail poultry meat: analysis of influencing factors. *Food Microbiol.* 2017; 62:232-238. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.028.
- Svrčinová P, Janout V. Comparison of official food safety control systems in member states of the European Union. *Cent Eur J Public Health.* 2018; 26(4):321-325. doi: 10.21101/cejph.a4940.
- Torgerson PR, Devleeschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Willingham AL, Kasuga F, Rokni MB, Zhou XN, Fèvre EM, Sripa B, Gargouri N, Fürst T, Budke CM, Carabin H, Kirk MD, Angulo FJ, Havelaar A, de Silva N. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Med.* 2015; 12(12):e1001920. doi: 10.1371/journal.pmed.1001920.
- Trevisani M, Diegoli G, Fedrizzi G. Public Health Hazards: C. Chemical hazards and their control. *Meat Inspection and Control in the Slaughterhouse.* 2014; 354-384.
- Turnes A., La sífilis en la medicina: a 100 años de un descubrimiento esencial, 2005. Disponible en: <http://www.smu.org.uy/dpmc/hmed/historia/articulos/sifilis.pdf>
- USFDA: U.S. Food and Drug Administration. Microbiological Sampling Assignment Summary Report: Raw Milk Cheese Aged 60 Days. 2016. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/99340/download>
- Van Den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 14(4):327-335. doi: 10.1016/s0924-8579(00)00145-x
- Van Hoek AHAM, Veenman C, van Overbeek WM, Lynch G, de Roda Husman AM, Blaak H. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2015; 204:1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015;40(4):277-83.
- Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, de Schaetzen MA, Van Huffel X, Imberechts H, Dierick K, Daube G,

-
- Saegerman C, De Block J, Dewulf J, Herman L. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(7):2643-2669. doi: 10.3390/ijerph10072643.
- Waglechner N, Culp EJ, Wright GD. Ancient Antibiotics, Ancient Resistance. *EcoSal Plus*. 2021; 9(2). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0027-2020.
- Wenguang X, Yongxue S, Zhenling Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018; 25(19):18377-18384. doi: 10.1007/s11356-018-1852-2
- Wielinga PR, Schlundt J. Food Safety: at the center of a One Health approach for combating zoonoses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013; 366:3-17. doi: 10.1007/82_2012_238.
- Windels EM, Van den Bergh B, Michiels J. Bacteria under antibiotic attack: different strategies for evolutionary adaptation. *PLoS Pathog*. 2020; 16(5). doi: 10.1371/journal.ppat.1008431.
- Wong TL, Whyte RJ, Cornelius AJ, Hudson JA. Enumeration of *Campylobacter* and *Salmonella* on chicken packs. *Br. Food J*. 2004; 106:651-662.
- Zbrun MV, Rossler E, Romero-Scharpen A, *et al*. Worldwide meta-analysis of the prevalence of *Campylobacter* in animal food products. *Res Vet Sci* 2020;132:69-77; doi: 10.1016/j.rvsc.2020.05.017.z.
- Zhang L, Fu Y, Xiong Z, Ma Y, Wei Y, Qu X, Zhang H, Zhang J, Liao M. Highly prevalent multidrug-resistant *Salmonella* from chicken and pork meat at retail markets in Guangdong, China. *Front Microbiol*. 2018; 9:2104. doi: 10.3389/fmicb.2018.02104.
- Zhao S, Mukherjee S, Chen Y, Li C, Young S, Warren M, Abbott J, Friedman S, Kabera C, Karlsson M, McDermott PF. Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(5):1314-1321. doi: 10.1093/jac/dkv001.

8. ANEXOS

8 Anexos

ANEXO I. Medios de cultivo utilizados

Agua de peptona

Digerido enzimático de caseína	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Agua	c.s.p. 1 L

Agua de peptona tamponada

Digerido enzimático de caseína	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Dihidrogenofosfato de potasio	1,5 g
Hidrógeno fosfato disódico	3,5 g
Agua	c.s.p. 1 L

Solución salina de peptona

Digerido enzimático de caseína	1,0 g
Cloruro sódico	8,5 g
Agua	c.s.p. 1 L

Caldo Muller Kaufmann

Extracto de carne	4,3 g
Peptona de caseína	8,6 g
Cloruro sódico	2,6 g
Carbonato cálcico	38,7 g
Tiosulfato sódico anhidro	30,5 g
Bilis	4,78 g
Verde brillante	0,0096 g
Novobiocina	0,040 g
Agua	c.s.p. 1 L

Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV)

Triptona	4,59 g
Caseína hidrolizada	4,59 g
Cloruro sódico	7,34 g
Fosfato monopotásico	1,47 g
Cloruro magnésico	10,93 g
Oxalato verde de malaquita	0,037 g
Agua	c.s.p. 1 L

Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)

Extracto de levadura	3,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
D(+) Lisina	5,0 g
Desoxicolato sódico	1,0 g
Tiosulfato sódico	6,8 g
Citrato de hierro amónico	0,8 g
Rojo fenol	0,08 g
Agua	c.s.p. 1 L

Chromagar para *Salmonella*

Cromopeptona	22,0 g
Mezcla cromógena	0,34 g
Agentes inhibidores	0,02 g
Agua	c.s.p. 1 L

Medio nutritivo

Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro sódico	8 g
Agua	c.s.p. 1 L

Triptona-Bilis-X-Glucurónico (TBX)

Triptona	20,0 g
Sales biliares	1,5 g
X-glucurónico	0,075 g
Agua	c.s.p. 1 L

Caldo Bolton

Peptona de carne	10,0 g
Hidrolizado de lactalbúmina	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Hemina	10,0 mg
Piruvato sódico	0,5 g
Ácido alfa-glutámico	1,0 g
Metabisulfito sódico	0,5 g
Carbonato sódico	0,6 g
Agua	c.s.p. 1 L

Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón modificado (mCCD)

Caldo nutritivo núm. 2	25,0 g
Carbon vegetal	4,0 g
Hidrolizado ácido de caseína	3,0 g
Desoxicolato sódico	1,0 g
Sulfato ferroso	0,25 g
Piruvato sódico	0,25 g
Agua	c.s.p. 1L

Skirrow

Músculo cardíaco, infusión de sólido	2,0 g
Digerido pancreático de caseína	13,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Vancomicina	0,01 g
Trimetoprim	0,005 g
Polimixina B	2500 UI
Sangre de caballo desfibrilada y lisada	7%
Agua	c.s.p. 1 L

Slanetz-Bartley

Triptosa	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Glucosa	2,0 g
Fosfato di-potásico	4,0 g
Azida sódica	0,4 g
TTC	0,10 g
Agua	c.s.p. 1 L

Bilis Esculina (BEA)

Peptona de carne	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Bilis de buey	40,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato de amonio férrico	0,5 g
Azida sódica	0,15 g
Citrato férrico	0,5 g
Agua	c.s.p. 1 L

Agar Sangre

Digerido pancreático de caseína	12,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne bovina	3,0 g
Almidón de maíz	1,0 g

Cloruro sódico	5,0 g
Sangre de carnero, desfibrinada	5%
Agar-agar	13,5 g
Agua	c.s.p. 1 L

Mueller-Hinton

Infusión de carne	2,0 g
Peptona de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agua	c.s.p. 1 L

Los medios fueron adicionados de un 2% de agar cuando se necesitaban sólidos.

ANEXO II. Relación de alimentos utilizados para el aislamiento de los diferentes microorganismos.

<i>Salmonella spp</i>	
Carne fresca de ave	Pollo entero Pechuga de pavo Pechuga de pollo Muslos de pollo
Carne fresca de ganado	Solomillo de ternera
Preparados de ave	Hamburguesa de pollo Hamburguesa pollo y pavo Longaniza de pollo Pelota de pollo
Preparados de ganado	Longaniza de pascua Longaniza fresca Chorizo fresco Esponja porcina Morcilla de cerdo Carne picada de ternera Pelota de cerdo
Preparados de frutas y hortalizas	Ensalada vegetal
Moluscos y pescados	Mejillones Tellinas Ostras Clóchinas Merluza

<i>Campylobacter spp</i>	
Matadero	Canal de pollo Piel de cuello
Punto de venta	Embalaje de pollo Pollo de engorde

<i>Enterococcus spp</i>	
Aguas de consumo humano	De pozo De fuentes y manantiales De ríos De red

<i>Escherichia coli</i>	
Preparados de ave	Hamburguesa de pollo Longaniza de pollo
Preparados de ganado	Hamburguesa de ternera Longaniza fresca Salchicha de cerdo Chorizo Jamón cocido
Preparados de frutas y hortalizas	Ensalada de tomate y lechuga Ensalada de col Horchata Frutas y verduras troceadas
Moluscos	Tellinas Chirlas
Aguas de consumo humano	De pozo De grifo De manantiales De fuentes
Lácteos	Medallón de queso de cabra Queso fresco Queso pasteurizado Queso semicurado de oveja