



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA
SALUD**
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**RESISTENCIAS A AGENTES
ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS DE
ORIGEN LÁCTEO Y AVÍCOLA**

**PRESENTADA POR:
MARÍA LUISA FERNÁNDEZ MÁRQUEZ**

**DIRIGIDA POR:
DRA. D^a. ROSARIO LUCAS LÓPEZ
DRA. D^a. MARÍA JOSÉ GRANDE BURGOS
DR. D. ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO**

JAÉN, 17 DE FEBRERO DE 2017

ISBN 978-84-9159-073-6

RESISTENCIAS A AGENTES ANTIMICROBIANOS EN BACTERIAS DE ORIGEN LÁCTEO Y AVÍCOLA

RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL AGENTS IN BACTERIA FROM DAIRY AND AVIAN ORIGIN

Memoria para optar al grado de Doctor
Jaén, Enero de 2017

Fdo.: M^a Luisa Fernández Márquez
Aspirante al Grado de Doctor

Los Directores del trabajo:

Fdo.: Rosario Lucas López Fdo: María José Grande Burgos

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

*Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud.
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.*

Los directores de tesis **D^a. Rosario Lucas López, D^a. María José Grande Burgos y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz**, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

HACEN CONSTAR: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Resistencias a agentes antimicrobianos en bacterias de origen lácteo y avícola”** presentado por **D^a. M^a Luisa Fernández Márquez** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor en la modalidad de Mención Internacional. La doctoranda ha realizado una estancia en *Public Health England* (Department of Health, UK Gov.) desde Enero de 2014 a Septiembre de 2015.

Jaén, Enero de 2017

Fdo.: Rosario Lucas López

Fdo.: María José Grande Burgos

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía), el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (grupo AGR230, Proyectos de Biomedicina Ref. UJA2013/10/06), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3).

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	9
I.- ALIMENTOS LÁCTEOS	10
I.1.- La leche	10
I.1.1.- Composición de la leche	10
I.1.2.- Microbiología de la leche	12
I.1.2.1.- Tipos de microorganismos en función de los efectos que producen	12
I.1.2.2.- Microorganismos habituales en la leche	12
I.1.2.3.- Fuentes de contaminación	15
I.1.3.- Impacto de las condiciones de almacenamiento y los tratamientos de la leche sobre los microorganismos	21
I.1.3.1.- Almacenamiento en frío	21
I.1.3.2.- Pasteurización	22
I. 2.- El queso	24
I.2.1.- Microbiota endógena y exógena del queso	24
II.- EL HUEVO	28
II.1.- Microorganismos contaminantes del huevo	31
II.1.1.- <i>Salmonella enterica</i>	31
II.1.2.- <i>Escherichia coli</i> patógeno	34
III.- RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS	35
III.1.- Biocidas	35
III.1.1.-Mecanismos de acción de los biocidas	43
III.1.2.-Tolerancia o resistencia a los biocidas	45
III.2.- Antibióticos	46
III.2.1.- Resistencia a antibióticos	49
III.3.- Aplicaciones de los antibióticos en el sector agroalimentario	50
III.3.1.- Uso de agentes antimicrobianos en el tratamiento de animales	50
III.3.2.- Uso de agentes antimicrobianos en alimentación animal	53

III.4.- Impacto del uso de antibióticos en el desarrollo de resistencias en animales productores de alimentos	56
III.5.- El papel del medio ambiente.....	61
III.6.- Co-resistencias a biocidas y antibióticos	62
IV.- BIOPELÍCULAS	65
OBJETIVOS	70
TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....	73
- ARTÍCULO 1: Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises.....	74
- ARTÍCULO 2: Biocide tolerance and antibiotic resistance in <i>Salmonella</i> isolates from hen eggshells.	76
- ARTÍCULO 3: Biofilm formation and sensitivity to chemical preservatives and other antimicrobial compounds in <i>Salmonella</i> isolates from hen eggshells.....	78
- ARTÍCULO 4: Virulence factors and antimicrobial resistance in <i>Escherichia coli</i> strains isolated from hen egg shells.....	80
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES	102
CONCLUDING REMARKS.....	105
REFERENCIAS.....	108

RESUMEN

La tolerancia a biocidas, junto con la resistencia a los antibióticos en la cadena alimentaria, ha suscitado una preocupación por la posible selección de cepas resistentes a antibióticos provocada por el uso indiscriminado de biocidas. Por tanto, esta tesis doctoral se centró en el estudio de la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos en bacterias aisladas de dos fuentes habituales: instalaciones de procesamiento de leche y queso, y de huevos.

En primer lugar, se aisló una colección de 120 cepas bacterianas de pequeñas y medianas empresas dedicadas a la producción de leche de vaca y a la fabricación de queso de cabra y se ensayó su sensibilidad frente a diferentes biocidas como cloruro de benzalconio (BC), cetrimida (CT), cloruro de hexadecilpiridinio (HDP), triclosán (TC), hexaclorofeno (CF) y polihexametileno biguanida (PHMG). Se seleccionaron diecinueve cepas según su tolerancia a biocidas y mediante la secuenciación del ADNr 16S se identificaron como *Lactococcus* sp. (6) *Enterococcus* sp. (1), *Lactobacillus* sp. (4), *Bacillus* sp. (1) *Escherichia* sp. (5), *Enterobacter* sp. (1) y *Helicobacter* sp. (1). Además se caracterizaron según su resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípicamente. Varios de los aislados presentaban resistencias múltiples (tres o más agentes) a biocidas o antibióticos, pero sólo dos de las cepas (identificadas como *Escherichia* sp. y *Enterobacter* sp.) presentaban resistencias múltiples tanto a biocidas como a antibióticos. El análisis estadístico de la tolerancia a biocidas y la resistencia a antibióticos reveló una correlación positiva significativa entre diferentes biocidas y entre biocidas y antibióticos. Los genes de resistencia a biocidas que se encontraron con mayor frecuencia fueron *qacEΔ1* y *qacA/B*. El gen de resistencia a la sulfonamida *sulI* se encontró en dos de los aislados, *Escherichia* sp. y *Enterobacter* sp., los cuáles también llevaban el gen *qacEΔ1*. También se detectaron genes de resistencia a beta-lactámicos (*bla_{CTX-M}*, *bla_{PSE}*) y a la tetraciclina [*tet(A)*, *tet(C)* y *tet(D)*]. En la mayoría de las cepas Gram-negativas aisladas se encontraron los genes que codifican para las bombas de exporte *acrB* y *mdfA*. Los resultados de este estudio sugieren que la exposición a biocidas puede seleccionar de forma indirecta la resistencia a antibióticos.

Uno de los objetivos principales del presente estudio fue determinar la tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* aisladas de cáscara de huevo de gallina. Se identificaron un total de 39 cepas tolerantes a biocidas, aisladas de cáscara de huevo, que según la secuenciación del ADNr 16S se identificaron como

Salmonella sp., o *Salmonella enterica*. Aquellas cepas aisladas que presentaban concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) superiores a las CMI del fenotipo salvaje fueron consideradas cepas tolerantes a biocidas: cloruro de benzalconio (7.7%); cetrimida (7.7%); cloruro de hexadecilpiridinio (10.3%); triclosan (17.9%); hexaclorofeno (30.8%); P3-oxonia (25.6%). Las 21 cepas aisladas tolerantes a biocidas fueron caracterizadas posteriormente. La mayoría de ellas (95,2%) eran resistentes a la ampicilina, y sólo el 9,5% eran resistentes a la cefotaxima y a la ceftazidima. También se detectó resistencia al cloranfenicol (61,9%), tetraciclina (47,6%), estreptomina (19,0%), ácido nalidíxico (28,6%), ciprofloxacina (9,5%), netilmicina (14,3%) y trimetoprim-sulfametoxazol (38,1%). El 66.7% de las cepas aisladas eran multirresistentes y el 90,5% se consideraron multirresistente a la combinación de antibióticos y biocidas. Los determinantes genéticos que confieren resistencia y las bombas de exporte detectados incluyen *acrB* (95,2%), *oqxA* (14,3%), *mdfA* (9,5%), *qacA/B* (4,8%) y *qacE* (9,5%). Los genes de resistencia a antibióticos detectados incluyen *bla_{TEM}* (14,3%), *bla_{CTXM-2}* (4,8%), *bla_{PSE}* (4,8%), *floR* (19,05%), *tet(A)* (9,5%), *tet(C)* (4,8%), *dfrA12* (0,05%) y *dfrA15* (0,05%). Se detectaron correlaciones positivas significativas entre la tolerancia fenotípica/resistencia a biocidas, entre biocidas y antibióticos, y también entre antibióticos, lo que sugiere que un uso generalizado de los biocidas podría influir en la resistencia a los antibióticos.

Para las 21 cepas seleccionadas de acuerdo con su tolerancia a biocidas, se estudió la capacidad de formación de biofilms, la sensibilidad a compuestos fenólicos y a conservantes químicos y antimicrobianos catiónicos. Un 14,3% de las cepas aisladas tenían poca capacidad para formar biofilms sobre placas de poliestireno, pero el resto presentaban una capacidad media de formación de biofilm (33,3%) o alta (52,4%). Las CMI para los antimicrobianos ensayados estaban en un rango entre un 3 y un 6% (p/v) para el lactato sódico, de 1 a 3% para el fosfato trisódico, del 0,05% a 0,25% para carvacrol, de 0,125% a 0,25% para timol, y de 2,5 a 16 mg/l para la polimixina B. La mayoría de las cepas aisladas eran resistentes a las tres combinaciones de lisozima-EDTA ensayadas. De acuerdo con estos resultados, el fosfato trisódico y los compuestos fenólicos son los mejores candidatos para la inactivación de *Salmonella*.

Los huevos pueden portar cepas patógenas de *Escherichia coli*, tanto patógenas extraintestinales (ExPEC) como diarreogénicas (DEC), que además puede ser

resistentes a antibióticos. El amplio uso de biocidas y desinfectantes en la industria alimentaria puede inducir tolerancia a biocidas en las bacterias. El objetivo del presente estudio fue evaluar la tolerancia a biocidas y la resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de cáscara de huevos de gallina. Se estudiaron un total de 27 cepas aisladas de una colección de 180 huevos. Siete de los aislados llevaban los dos genes, *eae* y *bfpA*, típicos de las cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC), mientras que las 14 restantes sólo llevaban el gen *eae* asociado con cepas EPEC atípicas. Los genes de la toxina Shiga *stx* y *stx2* se detectaron en cuatro de las cepas. Se detectaron también genes para las enterotoxinas sensibles y resistentes al calor así como el gen *aggR*. Varias cepas aisladas tenían CMI's superiores al fenotipo salvaje para biocidas como el cloruro de hexadecilpiridinio (18,52%) o el desinfectante comercial P3 oxonia (14,81%). Se detectó también resistencia a antibióticos como la ampicilina (37,03%), estreptomycin (37,03%), tetraciclina (37,03%), cloranfenicol (11,11%), ácido nalidíxico (18,51%) y trimetoprim-sulfametoxazol (14,81%). Ocho aislados (29,63%) eran tolerantes a los biocidas y resistentes a los antibióticos. Los genes para bombas de exporte detectados incluyen *acrB* (96,29%), *mdfA* (85,18%) y *oqxA* (37,03%), además de los genes de resistencia a compuestos del amonio cuaternario (QAC) *qacA/B* (11,11%) y *qacE* (7,40%). Los genes de resistencia a antibióticos detectados fueron *bla*_{CTX-M-2} (22,22%), *bla*_{TEM} (3,70%), *bla*_{PSE} (3,70%), *tet(A)*, (29,63%), *tet(B)* (29,63%), *tet(C)* (7,40%), *tet(E)* (11,11%), *aac(6')-Ib* (3,70%), *sulI* (14,81%), *dfrA12* (3,70%) y *dfrA15* (3,70%). La mayoría de los aislados (96,30%) presentaban más de un gen de resistencia. Las combinaciones más frecuentes fueron entre los componentes de las bombas de exporte *acrB* y *mdfA* con genes de resistencia a tetraciclina (33,33% de las cepas aisladas). Las cepas aisladas que presentaron genes de resistencia a QAC también llevaban adicionalmente entre 5 y 8 de los genes de resistencia a antimicrobianos investigados. Independientemente de la tolerancia a los biocidas y de la resistencia a los antibióticos, todas las cepas aisladas fueron sensibles al carvacrol (0,25%), timol (0,125%) y al fosfato trisódico (1 a 1,5%), pero mostraron una respuesta heterogénea frente al lactato sódico y a las combinaciones de lisozima-EDTA ensayadas, que aparentemente no estaba relacionada con la resistencia a los antibióticos. Los resultados de este estudio revelan una baja incidencia de la tolerancia a biocidas, pero también cabe destacar la presencia de cepas multirresistentes portadoras de muchos determinantes genéticos de resistencia.

SUMMARY

Biocide tolerance coupled to antibiotic resistance in the food chain has raised concerns about possible co-selection of antibiotic-resistant strains by the indiscriminate use of biocides. Therefore, this PhD thesis focused on the study of biocide tolerance and antibiotic resistance in bacteria isolated from two common sources: milk and cheese processing facilities, and eggs.

A collection of 120 bacterial isolates from small medium enterprises involved in the production of cow milk and the manufacture of goat cheese were screened for sensitivity to biocides benzalkonium chloride (BC), cetrimide (CT), hexadecylpyridinium chloride (HDP), triclosan (TC), hexachlorophene (CF) and poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride (PHMG). Nineteen isolates were selected according to biocide tolerance and identified by 16S rDNA sequencing as *Lactococcus* sp. (6) *Enterococcus* sp. (1), *Lactobacillus* sp. (4), *Bacillus* sp. (1) *Escherichia* sp. (5), *Enterobacter* sp. (1) and *Helicobacter* sp. (1). These were further characterised regarding antimicrobial resistance phenotype and genotype. Several isolates were multiply (3 or more) tolerant to biocides or resistant to antibiotics, but only two *Escherichia* sp. isolates and *Enterobacter* sp. were multiply resistant to biocides and antibiotics. Statistical analysis of biocide tolerance and antibiotic resistance revealed significant positive correlations between different biocides and between biocides and antibiotics. The biocide tolerance genes most frequently found were *qacEΔ1* and *qacA/B*. The sulfonamide resistance gene *sulI* was found in two *Escherichia* sp. isolates and in *Enterobacter* sp., all of which also carried *qacEΔ1*. Beta-lactam (*bla_{CTX-M}*, *bla_{PSE}*) and tetracycline resistance genes [*tet(A)*, *tet(C)* and *tet(D)*] were detected. Efflux pump genes *acrB* and *mdfA* were found in most Gram-negative isolates. Results from the study suggest that exposure to biocides can indirectly select for antibiotic resistance.

One aim of the present study was to determine biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen eggshells. A total of 39 isolates from hen eggshells identified as either *Salmonella* spp. or *Salmonella enterica* according to 16S rDNA sequencing were selected for biocide tolerance. Isolates with minimum inhibitory concentrations (MICs) above the wildtype MICs were considered to be biocide tolerant: benzalkonium chloride (7.7%); cetrimide (7.7%); hexadecyl pyridinium chloride (10.3%); triclosan (17.9%); hexachlorophene (30.8%); P3-oxonia (25.6%). The resulting 21 biocide-tolerant isolates were further characterised. Most isolates (95.2%)

were resistant to ampicillin, but only 9.5% were resistant to cefotaxime as well as to ceftazidime. Resistance to chloramphenicol (61.9%), tetracycline (47.6%), streptomycin (19.0%), nalidixic acid (28.6%), ciprofloxacin (9.5%), netilmicin (14.3%) and trimethoprim/sulfamethoxazol (38.1%) was also detected. Considering only antibiotics, 66.7% of isolates were multiresistant; furthermore, 90.5% were multiresistant considering antibiotics and biocides combined. Efflux pump and biocide tolerance genetic determinants detected included *acrB* (95.2%), *oqxA* (14.3%), *mdfA* (9.5%), *qacA/B* (4.8%) and *qacE* (9.5%). Antibiotic resistance genes detected included *bla_{TEM}* (14.3%), *bla_{CTXM-2}* (4.8%), *bla_{PSE}* (4.8%), *floR* (19.05%), *tet(A)* (9.5%), *tet(C)* (4.8%), *dfrA12* (0.05%) and *dfrA15* (0.05%). Significant positive correlations were detected between phenotypic tolerance/resistance to biocides, biocides and antibiotics, and also between antibiotics, suggesting that a generalized use of biocides could co-selected antibiotic resistance.

In a further study, a collection of 21 antibiotic-resistant *Salmonella* isolates from hen eggshells previously selected according to their biocide-tolerance phenotype were inspected for biofilm formation capacity and sensitivity to phenolic compounds, chemical preservatives and cationic antimicrobials. A 14.3% of isolates had a low capacity to form biofilms on polystyrene surfaces, but the rest had medium (33.3%) or high (52.4%) biofilm formation capacity. MICs were in the range of 3 to 6% (wt/vol) for sodium lactate, 1 to 3% for trisodium phosphate, 0.05% to 0.25% for carvacrol, 0.125% to 0.25% for thymol, or 2.5 to 16 mg/l for polymyxin B. Most isolates were resistant to lysozyme-EDTA combinations. According to these results, trisodium phosphate and phenolic compounds are the best candidates for inactivation of *Salmonella*.

Eggs may contain extraintestinal pathogenic (ExPEC) and diarrheogenic (DEC) *Escherichia coli* which in addition may carry antibiotic resistance. The wide use of biocides and disinfectants in the food industry may induce biocide tolerance in bacteria. The aim of the present study was to evaluate biocide tolerance and antibiotic resistance in *E. coli* from hen egg shells. A total of 27 isolates obtained from a screening of 180 eggs were studied. Seven isolates carried both *eae* and *bfpA* genes of typical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains, while 14 isolates only carried *eae* associated with atypical EPEC strains. Shiga toxin genes *stx* and *stx2* were detected in four

isolates. Heat-stable and heat-labile enterotoxin genes as well as *aggR* were also detected. Several isolates had MICs that were higher than the wild-type for the biocide hexadecylpyridinium chloride (18.52%) or the commercial disinfectant P3 oxonia (14.81%). Antibiotic resistance was detected for ampicillin (37.03%), streptomycin (37.03%), tetracycline (37.03%), chloramphenicol (11.11%), nalidixic acid (18.51%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (14.81%). Eight isolates (29.63%) were biocide tolerant and antibiotic resistant. Efflux pump genes detected included *acrB* (96.29%), *mdfA* (85.18%) and *oxqA* (37.03%), in addition to quaternary ammonium compounds (QAC) resistance genes *qacA/B* (11.11%) and *qacE* (7.40%). Antibiotic resistance genes detected included *bla_{CTX-M-2}* (22.22%), *bla_{TEM}* (3.70%), *bla_{PSE}* (3.70%), *tet(A)*, (29.63%), *tet(B)* (29.63%), *tet(C)* (7.40%), *tet(E)* (11.11%), *aac(6')-Ib* (3.70%), *sulI* (14.81%), *dfrA12* (3.70%) and *dfrA15* (3.70%). Most isolates (96.30%) carried more than one genetic determinant of resistance. The most frequent combinations were efflux pump components *acrB* and *mdfA* with tetracycline resistance genes (33.33% of isolates). Isolates carrying QAC resistance genes also carried between 4 and 8 of the additional antimicrobial resistance genes investigated. Regardless of biocide tolerance and antibiotic resistance, all isolates were sensitive to carvacrol (0.25%), thymol (0.125%) and trisodium phosphate (1 to 1.5%), but they exhibited a heterogeneous response to sodium lactate and lysozyme-EDTA combinations that apparently were not related with antibiotic resistance. Results from the study reveal a low incidence of biocide tolerance but also the presence of multiple resistance strains carrying multiple genetic determinants of resistance.

INTRODUCCIÓN

I.- ALIMENTOS LÁCTEOS

I.1.- La leche

La leche desde un punto de vista biológico, es la secreción de las hembras de los mamíferos, cuya misión es satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido en sus primeros meses de vida. Desde un punto de vista legal, se entiende por leche natural al producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas. La leche de otras especies de mamíferos se designa indicando el nombre de la especie (p.ej., leche de cabra o leche de oveja).

Según el BOE del 24/09/1994, se entiende por leche natural y cruda la producida por la secreción de la glándula mamaria de vacas, ovejas o cabras que no haya sido calentada a una temperatura superior a 40°C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente. Según el Codex Alimentarius, leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros, obtenida mediante uno o más ordeños, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior.

I.1.1.- Composición de la leche

En cuanto a su composición la leche está compuesta por grasa, lactosa, proteínas y sales minerales (ICMSF, 1998).

- Grasa

Es muy importante por sus implicaciones tecnológicas (fabricación de natas, mantequillas, etc.) y nutricionales. La leche posee 30-40 g/l de materia grasa, por lo que constituye el segundo componente mayoritario.

- Proteínas

En la leche se distinguen dos grupos de compuestos nitrogenados: las proteínas y las sustancias no proteicas. Ambas se diferencian por el tamaño de sus moléculas. Dentro de las proteínas se distinguen a) las caseínas que son moléculas de gran tamaño que contienen un gran número de aminoácidos; b) las proteínas del lactosuero que

suponen alrededor del 20% del contenido total de proteínas de la leche. Se definen como las proteínas que quedan en solución cuando el pH de la leche se lleva hasta 4,6 (punto isoelectrico de la caseína). Son sensibles al calor, por lo que cuando se somete la leche a tratamiento térmico parte se desnaturalizan. Tienen gran interés en la industria alimentaria. Se pueden obtener por procesos de ultrafiltración y se utilizan para la elaboración de preparados para lactantes y preparados de continuación.

- **Lactosa**

Es un hidrato de carbono que sólo se encuentra en la leche. Existen diferencias en su contenido en la leche de distintas especies. Se sintetiza en las células alveolares de la glándula mamaria a partir de la glucosa sanguínea, y en el caso de los rumiantes, también a partir de ácidos volátiles como el ácido propiónico. Tiene una serie de propiedades que influyen en las características químicas y organolépticas de la leche, como son: un sabor dulce débil, es sensible al calor y es un azúcar que puede ser fermentado por determinadas bacterias para producir ácido láctico. Éste origina una disminución de pH indispensable para lograr la coagulación en la elaboración de leches fermentadas y quesos frescos.

- **Sales minerales**

La leche contiene entorno al 1% de sustancias minerales. Contiene sales tanto disueltas como en estado coloidal formando compuestos con la caseína. La mayoría son sales inorgánicas (fosfatos), aunque también hay de origen orgánico (citratos).

- **Vitaminas**

La leche es de los alimentos que contiene la variedad más completa de vitaminas aunque algunas están presentes en cantidades pequeñas o despreciables. El contenido vitamínico depende de la alimentación y del estado de salud del animal. Los tratamientos también pueden disminuir el contenido. Las hidrosolubles (vitaminas del grupo B, vitamina C) se encuentran en la fase acuosa (suero), mientras que las liposolubles (A, D, E, K) se encuentran en la materia grasa. Este hecho tiene sus repercusiones en el tipo de leche que se consume (Ruíz López, 2010).

I.1.2.- Microbiología de la leche

I.1.2.1.- Tipos de microorganismos en función de los efectos que producen

Los microorganismos susceptibles de desarrollarse en la leche pueden clasificarse en tres grandes grupos:

1. Los que causan **alteraciones** de la leche originando grandes pérdidas económicas en las industrias alimentarias.
2. Los que provocan enfermedades en las personas, llamados **patógenos**.
3. Los **beneficiosos**, como aquellos que causan la fermentación natural de la lactosa en ácido láctico. Éstos son utilizados por quienes procesan la leche para elaborar productos como queso o yogur. Originan cambios en la textura, sabor y olor muy positivos para el producto (García, 2013).

I.1.2.2.- Microorganismos habituales en la leche

De la gran variedad de microorganismos existentes, los de mayor importancia en la industria lechera son (Jay et al., 2005):

A) Bacterias

- Bacterias ácido lácticas (BAL)
Producen ácido láctico a partir de la lactosa. Son fundamentales en la elaboración de productos lácteos, donde destacan bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. La fermentación de la lactosa puede realizarse por dos vías:
 - Homoláctica. Casi toda la lactosa es transformada en ácido láctico. Es llevada a cabo por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, etc...

- Heteroláctica. Además de ácido láctico se producen otros productos metabólicos finales como ácido acético, alcohol etílico y dióxido de carbono. Es el caso de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc cremoris*, etc...

Las BAL ejercen efectos muy beneficiosos en los productos lácteos porque algunas especies producen sustancias que inhiben el desarrollo de microorganismos no deseados, compiten con ellos por los nutrientes y dificultan su establecimiento por la disminución del pH asociado a la producción de ácido láctico (Leroy y De Vuyst, 2004; Widyastuti et al., 2014) .

- Micrococos

Suelen contaminar la leche cruda llegando a constituir la microbiota más abundante. En ocasiones pueden estar implicados en alteraciones de la leche cruda por su capacidad proteolítica.

- Estafilococos

Son de gran importancia desde un punto de vista sanitario debido a que producen una toxina responsable de originar intoxicaciones alimentarias. Destaca *Staphylococcus aureus*, que es capaz de producir una toxina resistente a los tratamientos térmicos. También están relacionados con la aparición de mastitis en las vacas, cabras y ovejas, pudiendo pasar durante el ordeño a la leche.

- Bacterias esporuladas

Se caracterizan por su capacidad de producir esporas. Destacan las del género *Bacillus* y *Clostridium*. Su repercusión en la leche cruda no es de importancia pero sí en los productos pasteurizados, debido a que las esporas son termoresistentes por lo que sobreviven a las altas temperaturas. Dentro de estas destaca *Clostridium botulinum*, que produce la enterotoxina responsable del botulismo.

- Enterobacterias

Son usadas como indicadores de contaminación fecal. Su hábitat natural es el intestino de los mamíferos por lo que su presencia en la leche cruda es por una contaminación con el estiércol o por malas prácticas higiénicas de los manipuladores.

Destacan las bacterias coliformes (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, etc...) que en muchas ocasiones están implicadas en la alteración por su actividad heterofermentativa, y *Proteus* por su actividad proteolítica.

- Otras bacterias

Bacterias como *Listeria monocytogenes*, que origina la listeriosis. En algunos estudios (Osman et al., 2014), se ha detectado la presencia, y caracterización del fenotipo, genotipo, factores de virulencia y la formación de biopelículas de *Listeria* aislada de la leche de cabra y oveja. Las muestras de leche fueron examinadas para detectar la presencia de especies patógenas de *Listeria*. Se aislaron *L. monocytogenes* y *Listeria ivanovii* mediante técnicas de aislamiento e identificación recomendadas por las normas ISO, además de una investigación serológica y pruebas de patogenicidad in vitro e in vivo.

B) Levaduras

Realizan fermentaciones tomando como base un azúcar. Algunas son capaces de fermentar la lactosa. La presencia en la leche de levaduras es indicio de que no se han llevado a cabo prácticas higiénicas adecuadas, o bien se ha contaminado con la ubre o por el ambiente. También hay levaduras que tienen una acción beneficiosa en la maduración de quesos y en la fabricación de Kéfir y Kumis. Algunas de estas pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces*.

C) Mohos

No forman parte de la microbiota normal de la leche, pero pueden aparecer y desarrollarse en ella si se han llevado a cabo manipulaciones poco higiénicas. Algunos son peligrosos para la salud ya que son capaces de producir micotoxinas. Otras veces son inoculados en ciertos productos a causa de las ventajas que ofrecen en la maduración de los quesos. Destacan algunos pertenecientes al género *Penicillium* y *Geotrichum*.

D) Virus

En la leche cruda no es habitual, pero puede verse contaminada por el virus de la hepatitis A. Los de mayor importancia en la industria láctea son los bacteriófagos o fagos, que pueden atacar a las bacterias lácticas que intervienen en la elaboración de productos lácteos fermentados (García, 2013).

I.1.2.3.- Fuentes de contaminación

Parece ser que la leche presente en las ubres sanas es estéril pero después es colonizada por diferentes tipos de microorganismos. La contaminación microbiana proviene de varias fuentes (Figura 1), entre las que se pueden mencionar: las ubres del animal, los utensilios y el equipo utilizado para el ordeño, los ensilados, las personas, los insectos y el medio (Quigley et al., 2013). Todas estas fuentes de contaminación hacen que, en condiciones higiénicas, la leche cruda posea un contenido promedio de microorganismos de 10^5 UFC/ml; si tiene una carga microbiana mayor, se dice que no es apta para el procesamiento (Hernández, 2003; Frank, 2007; Quigley et al., 2013).

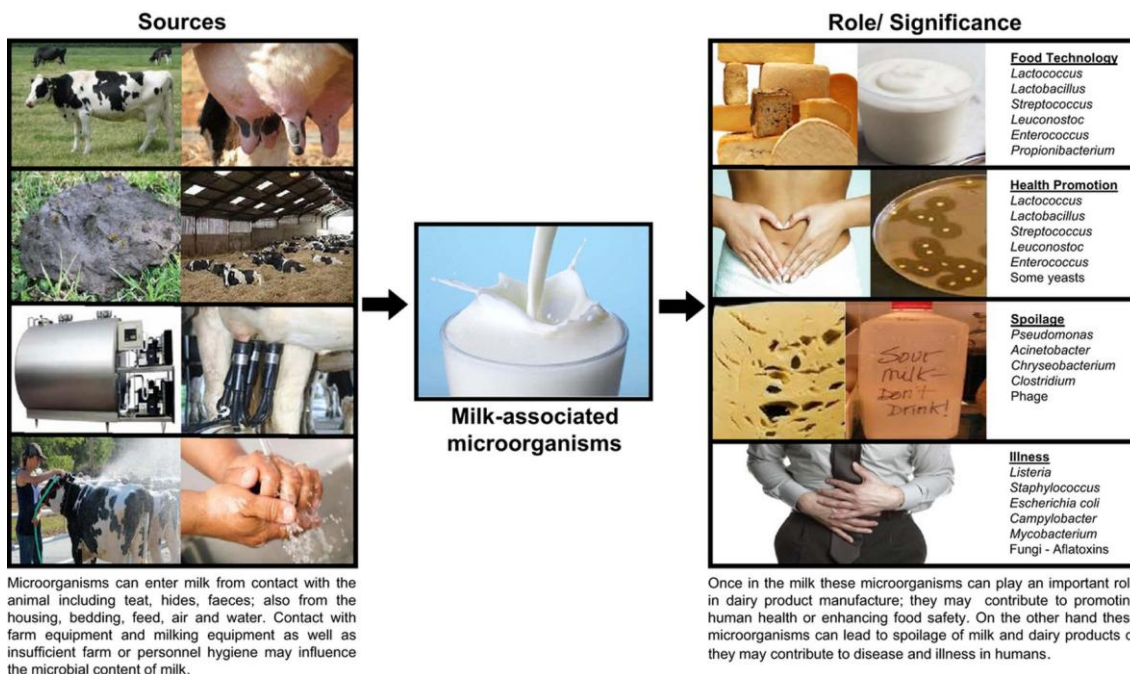


Figura 1. Fuentes potenciales de microorganismos en la leche cruda, y su papel/significado en la misma (Adaptado de Quigley et al., 2013).

- Ubres

La leche en el interior de una ubre sana contiene relativamente pocos microorganismos, pero la superficie externa puede contener un gran número. La suciedad (barro seco o el estiércol en el forraje y en el pelo del animal), puede transmitir millones de bacterias a la leche. Es importante mantener buenas prácticas en el ordeño y en la limpieza de las ubres. Si además el animal sufre de infecciones como la mastitis, la leche puede contener microorganismos patógenos. Es el caso de microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* y los estafilococos. La superficie del pezón del ganado bovino puede contener una gran diversidad bacteriana (Braem et al., 2012; Monsallier et al., 2012; Quigley et al., 2013; Verdier-Metz et al., 2012). Un estudio detallado empleando métodos dependientes de cultivo, reveló la presencia de bacterias pertenecientes a los phyla *Firmicutes* (76%), *Actinobacteria* (4,9%), *Proteobacteria* (17,8%) y *Bacteroides* (1,3%). Cuando este estudio se completó con otro basado en la secuenciación de una librería de clones, se detectaron algunos phyla adicionales, como *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* y otras bacterias no clasificadas (Verdier-Metz et al., 2012). En particular, un alto porcentaje de las lecturas de este y otros estudios (Fricker et al., 2011) correspondían a bacterias aún no identificadas. De aquellas que pudieron identificarse, muchas eran bacterias tecnológicamente importantes como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* spp. También se identificaron bacterias que pueden estar implicadas en el desarrollo del sabor, aroma y color en el queso, tales como estafilococos coagulasa-negativos, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* y *Corynebacterium* spp. Sin embargo, algunos de los microorganismos detectados en la superficie del pezón, por ejemplo, *Solobacterium*, *Clavibacter* y *Arcanobacterium* spp., no han sido identificados en la leche (Verdier-Metz et al., 2012), lo que sugiere que estos microorganismos son poco competitivos en los ambientes lácteos en caso de que se hubiera producido una transferencia a los mismos. También se observó que la composición de la comunidad microbiana en la superficie de la ubre variaba cualitativa y cuantitativamente de una granja a otra (Verdier-Metz et al., 2012). Esto puede atribuirse a diferentes factores; por ejemplo, los microorganismos que se asocian con el material utilizado para la fabricación del lecho podrían contaminar la superficie de la ubre y entrar en contacto con la leche (Vacheyrou et al., 2011).

- **Equipos y utensilios**

Materiales para el ordeño, filtros, etc... acumulan microorganismos heterótrofos si no se lavan y desinfectan después de su uso. Las máquinas de ordeño pueden actuar como reservorios de microorganismos y, por tanto, es de esperar que, las diferentes máquinas y prácticas relacionadas con el ordeño puedan influir en la población microbiana presente en la leche ordeñada (Michel et al., 2006). Los equipos de madera, o aquellos cuyo diseño no es liso, resultan muy difíciles de limpiar y proporcionan lugares aptos para el desarrollo de microorganismos. Los filtros de tela deben ser lavados cuidadosamente y secados. Un diseño inadecuado y un mantenimiento insuficiente pueden ser la causa de la aparición de plagas de insectos y roedores, así como un medio ideal para la proliferación de microorganismos.

- **Personal encargado del ordeño**

Al pasar de un animal a otro, el ordeñador puede transmitir los microorganismos patógenos a todo el rebaño, lo que contaminaría toda la leche. Esto tiene gran importancia en el ordeño manual. Si una persona padece alguna infección, también puede infectar la leche, volviéndola no apta para el consumo humano (Dhanashekar et al., 2012). No obstante, la mecanización del proceso ha permitido que el personal manipulador no suponga un foco importante de contaminación, adquiriendo mayor importancia las contaminaciones causadas por el equipo de ordeño y los tanques de almacenamiento.

- **Ambiente**

Tanto el interior como los alrededores de las instalaciones donde se realiza el ordeño, pueden afectar a los niveles de contaminación en la leche. Si el ordeño se realiza en el interior del establo, existe un alto riesgo de contaminación a través del aire y de los insectos que están en el lugar, particularmente las moscas. Es más adecuado realizar el ordeño en un ambiente especial, pero si no es posible, es preferible que esta tarea se realice en el pastizal y no en el establo. Con respecto a factores ambientales más generales, se ha observado que los microorganismos presentes en la leche de vaca dependen de si los animales son alimentados en el interior de una nave o al aire libre

(Quigley et al., 2013). En un estudio comparativo, se detectó un aumento en *Staphylococcus* spp. en el caso de animales alimentados al aire libre (Hagi et al., 2010).

También depende de la localización de los animales (Bonizzi et al., 2009) y de la etapa de lactancia en la que se encuentren (Callon et al., 2007). En un estudio para relacionar los microorganismos detectados en la leche con el lugar donde pastaban (Vacheyrou et al., 2011), destacaron 141 especies bacterianas representadas en 54 géneros, repartidas por toda la finca. Hubo 25 géneros detectados en muestras de leche, muchos de los cuales (incluyendo *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Brachy bacterium*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium* y *Pseudoclavibacter*) también se detectaron en diferentes áreas de la granja, como superficies de pezones, salas de ordeño, heno, en el aire y el polvo. Bacterias tecnológicamente relevantes como *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, *Leucobacter*, *Deinococcus* y *Paracoccus* se detectaron en la leche pero no fueron detectadas en el entorno de la granja. Del mismo modo, muchos otros taxones se detectaron en el entorno de la granja, pero no en la leche (Vacheyrou et al., 2011).

Por último, cabe destacar que la implementación de normas estrictas de higiene provoca una reducción de la carga microbiana de la leche, incluyendo una reducción de poblaciones de importancia tecnológica que, a su vez, puede afectar negativamente al queso elaborado por métodos tradicionales o artesanales (Monsallier et al., 2012). En efecto, Mallet et al. (2012) detectó reducciones de un orden de magnitud en las concentraciones de lactococos tecnológicamente relevantes presentes en la leche cruda en relación con los niveles detectados 15 años antes en la leche cruda recogida en la misma zona. Estas poblaciones parecen ser particularmente sensibles a los cambios en las prácticas agrícolas, mientras que otras poblaciones, como *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y levaduras, no se vieron afectadas. Si bien es importante garantizar una elevada calidad microbiológica de la leche, los productores de queso fabricado con leche cruda de forma tradicional deben ser conscientes de que ciertas prácticas agrícolas pueden tener un impacto negativo en los sabores y aromas distintivos como consecuencia de la limitación del número de determinados microorganismos y pueden por tanto necesitar compensar esto a través de la introducción de cultivos iniciadores y cultivos adjuntos.

- Ensilados

Los ensilados son una fuente de contaminación importante de microorganismos alterantes, patógenos, o productores de toxinas. Los principales agentes contaminantes son (1) esporas de bacterias Gram positivas anaerobias (especies de *Clostridium*) y aerobias (principalmente especies de *Bacillus* y *Paenibacillus*), (2) *L. monocytogenes* y en mucha menor medida *E.coli*, y (3) micotoxinas (Driehuis, 2013).

Las bacterias formadoras de endosporas representan un grupo importante en la contaminación de la leche cruda debido a la resistencia de las endosporas a los tratamientos térmicos y a otras condiciones ambientales desfavorables. Las esporas presentes en los ensilados y piensos, tras ser consumidas por el animal, pueden atravesar el tracto gastrointestinal y ser liberadas en las heces del animal. Las principales especies de bacterias anaerobias formadoras de endosporas que podemos encontrar en los ensilados se pueden clasificar en tres grupos atendiendo a su metabolismo de carbohidratos y proteínas (Pahlow et al., 2003). El primer grupo incluye a los clostridios proteolíticos, de los que *Clostridium sporogenes* es la principal especie en los ensilados. Obtienen energía mediante fermentación tanto de carbohidratos como de proteínas. El segundo, o grupo de *Clostridium butyricum*, fermentan una amplia variedad de carbohidratos, pero no proteínas. Muchas especies aisladas de ensilados identificadas fenotípicamente como *C. butyricum* se han asignado a nivel genético a *Clostridium beijerinckii*. El tercer grupo incluye a *Clostridium tyrobutyricum*, que fermenta un número limitado de carbohidratos pero que es capaz de fermentar el lactato generando acético y butírico a bajo pH. Además de los anteriores, en los ensilados se han encontrado concentraciones elevadas de esporas de *Clostridium saccharolyticum* y *Clostridium baratii*. *Clostridium botulinum* rara vez se encuentra en los ensilados (Driehuis, 2013). Su presencia se asocia a la contaminación por cadáveres de aves o pequeños animales muertos por accidente durante el cosechado (Cobb et al., 2002). Los purines de cerdos son una fuente muy importante de esporas de *C. botulinum*, y pueden contaminar las cosechas destinadas a la elaboración de ensilados si se emplean como fertilizantes (Livesey et al., 2004).

Los formadores de endosporas aerobios tienen una distribución ubicua, por lo que pueden encontrarse en una variedad de ambientes. En los ensilados se encuentran

representantes de las familias *Bacillaceae* y *Paenibacillaceae*, siendo las más frecuentes *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* y *Paenibacillus polymyxa*. También se aísla una amplia variedad de esporulados termorresistentes. Los más importantes en la industria láctea son *B. cereus* y los formadores de endosporas termorresistentes *Bacillus sporothermodurans* y *Geobacillus stearothermophilus*. *B. cereus* es uno de los principales alterantes de leche y otros lácteos pasteurizados refrigerados (Heyndrickx y Scheldeman, 2002). También se encuentra en la leche en polvo y en preparados de leche en polvo para lactantes. *B. sporothermodurans* y *G. stearothermophilus* son termófilos, y producen endosporas muy resistente al calor que pueden provocar problemas en productos tratados por UHT (Scheldeman et al., 2006).

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena que produce una alta tasa de mortalidad (EFSA-ECDC, 2015). Se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, incluyendo suelo, agua y vegetación. En ensilados, se detecta con gran frecuencia, asociada a alteraciones de tipo aerobio. Se han detectado brotes de listeriosis en vacas, ovejas y cabras asociados al consumo de ensilados contaminados con la bacteria (Ho et al., 2007). La contaminación de la leche se ha relacionado con la presencia de altas concentraciones de la bacteria en los ensilados (Tasci et al., 2010). Aunque se inactiva fácilmente por calor, su presencia en los ambientes de procesado es una fuente de contaminación de los productos acabados.

En los estadios iniciales del proceso de ensilado, las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* compiten con las BAL y con otros grupos por los nutrientes. La mayoría de las *Enterobacteriaceae* dejan de crecer y pierden viabilidad a valores de pH de 4 a 5, por lo que una bajada rápida de pH hace que sean desplazadas de la fermentación (como es el caso de *E. coli* O157:H7; Pedroso et al., 2010). Sin embargo, la presencia de oxígeno prolonga su supervivencia, y algunas de las que sobreviven pueden volver a crecer en la fase de almacenamiento, alcanzando elevadas concentraciones cuando el pH de los ensilados sube a consecuencia de alteraciones de tipo aerobio (Driehuis, 2013).

- Suministro de agua

El suministro de agua limpia resulta esencial para disminuir los niveles de contaminación. Utilizar agua contaminada para lavar las ubres de los animales y los utensilios, entre otros, puede ser causa de contaminación. Algunas bacterias presentes en el agua son peligrosas. Las bacterias coliformes que causan desórdenes gastrointestinales en los seres humanos, también pueden dar como resultado un producto de inferior calidad, como puede ocurrir en los quesos (Aguhob y Astell, 1998).

I.1.3.- Impacto de las condiciones de almacenamiento y los tratamientos de la leche sobre los microorganismos

I.1.3.1.- Almacenamiento en frío

Es importante comprender los cambios que pueden ocurrir en la microbiología de la leche cruda durante su almacenamiento y como consecuencia de los tratamientos posteriores. La leche se almacena básicamente a temperaturas de refrigeración que reducen el crecimiento de la mayoría de las bacterias, con la excepción de los microorganismos psicrotolerantes que pueden proliferar en estas condiciones y convertirse en la principal causa del deterioro de la leche (Frank, 2007; De Jonghe et al., 2011; Quigley et al., 2013). Esto se debe a la producción de enzimas extracelulares, siendo las lipasas y proteasas las más importantes. Las lipasas degradan la grasa de la leche causando rancidez, mientras que las proteasas degradan la caseína produciendo un color gris y un sabor amargo desagradable (De Jonghe et al., 2011). Las investigaciones sobre las variaciones estacionales en el crecimiento de microorganismos en la leche cruda han demostrado que las bacterias psicrotolerantes presentan un mejor crecimiento y una mayor producción de proteasa en la leche de invierno que en la leche de verano. Las especies de *Pseudomonas*, que normalmente se encuentran en la leche cruda, son la causa más común del deterioro de la leche (Ercolini et al., 2009). Las especies de *Pseudomonas* más comúnmente detectadas en la leche y en los quesos son *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas lundensis* (Mallet et al., 2012). Estas bacterias pueden convertirse en los microorganismos predominantes en la leche cruda almacenada a bajas temperaturas, constituyendo hasta un 70-90% de la población microbiana.

En la leche también están presentes muchos otros microorganismos psicrotolerantes, pero generalmente son de menor importancia que *Pseudomonas* con respecto al deterioro de la leche. En un estudio, se identificaron algunas cepas de *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y algunas BAL (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007). En otro estudio, donde se evaluó el impacto global del proceso de refrigeración (24 h) sobre la carga microbiana de la leche cruda, destacó particularmente el aumento de *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. fluorescens*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *Leuconostoc carnosum*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kocuria rosea*, bacterias del ácido propiónico y *Aeromonas* (Lafarge et al., 2004). Cabe destacar que algunos de estos últimos serían típicamente considerados como microorganismos termófilos. Un estudio similar, pero llevado a cabo durante un período de 48 horas, destacó de forma particular aumentos en las poblaciones de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* spp. (Raats et al., 2011) También se han detectado en la leche cruda nuevos psicrotrofos como *Chryseobacterium* (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007) y *Epilithonimonas* spp. (Shakēd et al., 2009). Sin embargo, su papel en el deterioro de la leche no está aún claro. También se han identificado varias especies de bacterias psicrótrofas formadoras de endosporas. Las levaduras y los mohos también se han asociado con el deterioro de la leche (Agarwal et al., 2012).

I.1.3.2.- Pasteurización

La pasteurización de la leche cruda se aplica para reducir su carga microbiana y, en particular, para limitar el número de microorganismos alterantes y prevenir así las enfermedades transmitidas por los alimentos. Sin embargo, este proceso también reduce el número de microorganismos que normalmente contribuirían a las propiedades sensoriales deseables en los quesos. En estos casos, los cultivos iniciadores que se sabe que generan sabores y aromas deseables, como se ha comentado anteriormente, se añaden tras la pasteurización de la leche. El tratamiento típico de pasteurización de la leche es un proceso de "alta temperatura en poco tiempo" (HTST) que implica un calentamiento a 72 °C durante 15 s. Algunos países han aumentado la temperatura y / o el tiempo de exposición. Esto puede ayudar a reducir aún más los recuentos bacterianos

y eliminar microorganismos de interés, incluyendo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y *L. monocytogenes*. También se ha sugerido que este tratamiento podría provocar la activación de esporas durmientes en la leche (Ranieri et al., 2009).

De forma general, los tratamientos térmicos aplicados a la leche reducen las poblaciones psicrótrofas y mesófilas, dejando principalmente dos grupos a considerar con posterioridad, es decir, los microorganismos termodúricos y las bacterias introducidas por contaminación post-pasteurización. Después de la pasteurización, algunos microorganismos pueden entrar en un estado "viable pero no cultivable", lo que significa que pueden ser subestimados por los métodos de cultivo tradicionales (Bartoszcz, 2009). Los hallazgos de un reciente estudio revelan la existencia de una población bacteriana más diversa de lo esperado en la leche pasteurizada (Quigley et al., 2013). Cuando consideramos las bacterias termodúricas, debemos tener en cuenta de un modo particular los microorganismos formadores de esporas. Estas bacterias pueden entrar en la cadena de la leche a través del suelo, del ensilaje y del material del lecho y son, significativamente resistentes a la pasteurización.

Los formadores de esporas tales como *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum* tienen la capacidad de sobrevivir y crecer a la temperatura de refrigeración, así como de utilizar carbohidratos, proteínas y lactatos procedentes de la leche (Driehuis, 2013). De hecho, los clostridios se han identificado con bastante frecuencia en la leche cruda (Cremonesi et al., 2012) y pueden contribuir al deterioro del queso causando un defecto de hinchamiento tardío, que está particularmente asociado con *C. tyrobutyricum*, y que conlleva la aparición de alteraciones de sabor y aroma y defectos en la textura del queso (Cocolin et al., 2004). Mediante las técnicas independientes de cultivo DGGE/TTGE se han identificado a *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii* como posibles causantes de este deterioro. Otros contaminantes esporulados de la leche incluyen a *B. cereus*, *B. sporothermodurans* y *G. stearothermophilus*. *B. cereus* es una bacteria alterante importante en leche pasteurizada y productos lácteos, almacenados a temperatura de refrigeración, provocando coagulación y alteración en el sabor. Esta bacteria también es un motivo de preocupación para la seguridad alimentaria, ya que puede producir diferentes tipos de toxinas y provocar intoxicaciones (Driehuis, 2013). En 2010, en la

UE, el 3,8% de todas las muestras de leche ensayadas dieron positivo para toxinas de *Bacillus* (European Food Safety Authority, 2012).

I.2.- El queso

De todas las definiciones posibles, definiremos éste alimento, según lo dispuesto en la norma general del Codex Alimentarius para el queso (CODEX STAN 283-1978). En esta norma, se entiende por queso, al producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

(a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o

(b) técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (a).

I.2.1.- Microbiota endógena y exógena del queso

Describir la microbiota que tiene relación con el queso, de una forma o de otra es una tarea ardua. Ya que en función al tipo de queso que describamos esta será diferente. Existen dos tipos de microorganismos, los que forma parte del queso, bien sea para producir ácido láctico y producir la coagulación de la leche o bien para dar lugar a las características organolépticas del queso en su etapa de maduración (Jay et al.,

2005). Éstos, son los que denominamos como microbiota endógena, forma parte del producto, y se compone principalmente de BAL, y algunos mohos y levaduras.

En un segundo grupo, se encuentra la microbiota exógena. Ésta está conformada por todos aquellos microorganismos ajenos al producto, que se encuentran en superficies, útiles y manipuladores, que podrán producir alteraciones e incluso toxiinfecciones. Se incluyen en este grupo: Enterobacterias, estafilococos, *Listeria*, y algunos mohos y levaduras (Abriouel et al., 2008). Esta microbiota, será la que determine, las características de calidad del queso.

La **microbiota endógena** característica del queso está formada por las BAL, además de levaduras (como *Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Saccharomyces* y *Torulopsis*) y mohos. Este último grupo de microorganismo sólo se encuentran en grupos muy concretos de quesos, y participan sobre todo en la conformación de las características organolépticas del queso, los más conocidos son *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum* que dan lugar a las venas azuladas de quesos como el Roquefort o *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum* que son hongos de crecimiento superficial, típicos del queso Camembert. Ambas participan activamente en las etapas de inoculación y maduración del queso, cumpliendo un papel fundamental en lo consumiremos como producto final.

Las BAL son Gram positivas, inmóviles y no esporuladas, que dan lugar a ácido láctico como principal o único producto de su metabolismo fermentativo. Este grupo de microorganismos no tienen ni porfirinas ni citocromos, por lo que no realizan fosforilación para el transporte de electrones, de manera que obtienen la energía sólo por fosforilación a nivel de sustrato. Todas crecen anaeróbicamente, a pesar de que la mayoría no son sensibles al oxígeno, por lo que las definimos como anaerobios aerotolerantes. La mayor parte de este grupo de microorganismos obtiene la energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, de modo que están restringidas a hábitats ricos en azúcares. Normalmente su capacidad biosintética es limitada y sus complejos requerimientos nutritivos incluyen: aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Las BAL son esenciales para la elaboración del queso (Caplice y Fitzgerald, 1999; Chamba e Irlenger, 2004; Jay et al., 2005). Los principales géneros de BAL son:

Lactococcus

El género *Lactococcus* es el principal grupo bacteriano en la elaboración del queso. Son cocos Gram positivos, microaerófilos, y homofermentadores, que generan L(+) lactato como principal producto de la fermentación de azúcares. Aparecen como células individuales, o bien en parejas o en cadenas. Algunas cepas son importantes tecnológicamente por su capacidad de utilizar el citrato, generando diacetilo y otros compuestos que contribuyen al sabor y aroma de los productos fermentados. La especie representativa del género, *L. lactis*, crece en diversos ambientes. Se encuentra con frecuencia en los vegetales y en el ambiente de las industrias lácteas, así como en una amplia variedad de productos lácteos fermentados. Se ha propuesto que los lactococos de los ambientes lácteos han evolucionado a partir de las cepas de vegetales (Bachmann et al., 2012). Las cepas de origen lácteo se caracterizan por ser auxotrofas para un elevado número de aminoácidos, y por su adaptación para utilizar las proteínas de la leche como fuente de aminoácidos. Para ello presentan un sistema proteolítico ligado a la pared celular que degrada la caseína a pequeños péptidos que luego son transportados al interior de la célula y transformados en aminoácidos por peptidasas intracelulares. También posee sistemas para el transporte de aminoácidos libres.

Streptococcus

El género *Streptococcus* comprende una gran variedad de especies con hábitats muy diferentes, cuyas actividades tienen considerable importancia práctica para la especie humana. Como productores de ácido láctico, algunos estreptococos desempeñan importantes funciones en la producción de leche ácida, ensilados y de otros fermentados (Peláez et al., 2005).

Leuconostoc

El género *Leuconostoc*, cocos morfológicamente similares a los estreptococos, pero heterofermentativos, se usan como cultivos iniciadores en fermentaciones lácteas y para la producción de grandes cantidades de polisacáridos.

Lactobacillus

Son típicamente bacilares, variando desde bacilos cortos y delgados a cortos y curvados, comprenden especies que son homofermentativas en su mayor parte, aunque

algunas heterofermentativas. El género está dividido en tres subgrupos, dentro de los cuales se contemplan más de 170 especies (Goldstein et al., 2015). Los lactobacilos se encuentran normalmente en productos lácteos y algunas cepas se usan en la preparación de derivados lácteos como es nuestro caso. Resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias productoras de ácido láctico, pueden crecer a valores de pH en torno a 4 ó 5, propiedad que les permite su asilamiento selectivo a partir de muestras naturales, empleando medios de cultivo de pH ácido que contengan carbohidratos, como el agar peptona con zumo de tomate. Su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, cuando el valor de pH ha descendido demasiado para que otras BAL puedan crecer. Por consiguiente, éstos llevan a cabo las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácido-lácticas.

Por otro lado la **microbiota exógena** va a depender no sólo del entorno, útiles, superficies y manipuladores, sino que obviamente, dependerá de las condiciones de la materia prima, en este caso de las condiciones higiénicas de la leche. Partiendo del hecho de que durante el procesado no se haya producido ningún tipo de fallo o accidente, uno de los riesgos más graves que presenta el queso estriba en la posible presencia de toxina estafilocócica. El crecimiento máximo de los estafilococos tiene lugar tras finalizar el desuerado y, por regla general, antes del salado o salmuerado del queso. Posteriormente, durante la maduración y secado, estos microorganismos van desapareciendo lentamente, y sólo una pequeña porción de la carga inicial se recupera al cultivarlos. Sin embargo la toxina producida se mantiene. El principal agente que sintetiza esta toxina es *S. aureus*, que se encuentra en las mucosas y piel de los manipuladores. Se transmite con facilidad si durante el procesado no se trabaja con unas buenas prácticas higiénicas.

Otro riesgo importante a tener en cuenta es la presencia de *E. coli* (bacilo anaerobio facultativo, Gram negativo, móvil por flagelos peritricos, no produce esporas, y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, incluye varios tipos de cepas patógenas, como comentaremos más adelante) y coliformes en general, en nuestro producto (Donnelly, 2004). Aunque los problemas que pueden ocasionar en el queso son de sobra conocidos, impedir tajantemente la presencia de estos microorganismos en muchas de sus variedades, puede resultar enormemente complicado, si el coliforme está presente en el inicio del proceso, es virtualmente imposible prevenir su crecimiento durante la

fabricación o durante la maduración. Incluso en algunos casos la presencia de *E. coli* se considera como algo característico. (Quigley et al., 2011). Está bien demostrado que si se encuentran cepas patógenas de *E. coli* en las primeras etapas de producción del queso, su cantidad puede incrementarse hasta niveles peligrosos.

Además de estos microorganismos de mayor incidencia en el queso, hay que determinar la presencia o ausencia de otros de los que se sabe pueden llegar hasta el producto por recontaminaciones del proceso, tras la pasteurización o terminación de la leche. Estos microorganismos son *Salmonella*, *L. monocytogenes* y la presencia de mohos y levaduras no deseables. Es aconsejable la aplicación de normas microbiológicas en el control de puntos críticos en la fabricación de queso y la industria debería establecerlas y usarlas como parte de un control de seguridad interno y de su sistema de autocontrol y de calidad.

En la producción de alimentos fermentados tradicionales incluyendo los quesos, son importantes las pequeñas y medianas empresas. En el ambiente donde se manipula la materia prima y donde se elaboran los quesos, pueden aparecer bacterias que pasarán a formar parte del producto final o incluso jugar un papel clave en el proceso de fermentación. Por tanto, puede ser interesante investigar su posible contribución en la transmisión de la resistencia a antimicrobianos en la cadena alimentaria.

II.- EL HUEVO

El huevo es el producto de la ovulación de las gallinas y otras aves. Según el Reglamento CE 589/2008 el huevo se define como el producto con cáscara sin romper, incubar o cocer de la especie *Gallus gallus*, apto para el consumo humano directo o para la elaboración de ovoproductos (Reglamento CE, 2008). El huevo es una estructura biológica natural con cáscara que proporciona protección al desarrollo de embriones de pollo. Entre los alimentos de origen animal, el huevo se considera como una fuente importante de proteína en la dieta de los humanos.

Según la Organización Mundial de la Salud - OMS, este alimento es una referencia de proteína a nivel mundial, con la cual se comparan las demás proteínas. Se

caracteriza por tener un alto valor nutritivo y un amplio uso a nivel industrial debido a sus propiedades funcionales (Mudambi, 2007; Vaclavik et al., 2007).

Los huevos que se incluyen dentro del grupo de alimentos proteicos, tienen una larga tradición de consumo y son apreciados en diferentes culturas por su facilidad de obtención, precio, cualidades culinarias, contenido de nutrientes y amplio aprovechamiento en la industria de alimentos (Hernández y López, 2010). Existe constancia de su utilización desde épocas muy antiguas en regiones de la India y China, posteriormente en Grecia y de su propagación por Europa. En sus inicios, la avicultura fue una actividad rural con condiciones muy precarias, solo hasta principios del siglo XX se presenta una selección de razas de gallinas para mejorar la producción y a partir de 1960 surge la avicultura intensiva con una producción promedio de 600 millones de docenas (Rodríguez y Magro, 2008).

La producción de huevos a nivel mundial es liderada por China, mientras que España ocupa el tercer lugar en la Comunidad Europea según los índices del año 2007. Por otro lado, el consumo por persona es en promedio de 8,2 kg de huevos anuales según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (M.A.A.M, 2011). A nivel comercial los huevos se identifican por categorías (A: Para huevos frescos, sin tratamientos de conservación ni refrigeración, B: si no cumplen con las características para ser A) y por peso (Clase XL: ≥ 73 g; L: entre 63 y 73 g; M: entre 53 y 63 g; S: < 53 g).

Son considerados una buena fuente de nutrientes, un alimento económico y multifuncional debido a que sus componentes tienen propiedades coagulantes, emulsionantes y espumantes. Los componentes del huevo lo hacen una excelente fuente de proteínas de alta calidad, vitaminas y minerales. Su perfil nutricional varía dependiendo de la parte analizada, y está también altamente influenciado por la composición de los piensos de la gallina y el sistema de crianza (USDA, 2008; Watson, 2008). De forma general, el huevo contiene de 12-14% de proteínas, caracterizadas por poseer un buen balance de aminoácidos esenciales. Es una fuente rica de lecitina, un fosfolípido que forma parte de la membrana celular de todas las células del organismo.

La grasa del huevo se caracteriza por ser fuente de ácidos grasos esenciales (como el ácido linoleico y araquidónico). Se encuentra en una forma altamente emulsionada lo cual facilita la digestión y absorción por el organismo (Srilakshmi, 2003). Las vitaminas A, D y E están presentes en la yema y son transportadas por los lípidos. La cáscara de huevo aunque se considera como no comestible, puede ser una buena fuente de calcio si es sometida a un proceso de pulverizado muy fino (Watson, 2008). También es una fuente importante de minerales, siendo de destacar el elevado aporte de selenio, potasio y fósforo, iodo y zinc (Ortega, 2003). Otros elementos traza que proporciona el huevo son cobre, manganeso y flúor pero también se encuentran cantidades abundantes de vitaminas, en especial vitamina B12, biotina, ácido pantoténico, riboflavina, vitamina D, niacina, vitaminas A, E y B1. Una ventaja de este alimento es que contiene tanto vitaminas hidrosolubles como liposolubles, que pueden ayudar a cubrir una parte considerable de las necesidades diarias (Vollmer et al., 1999; Sparks, 2000; Jay et al., 2005).

Los huevos recién puestos son generalmente estériles, sin embargo, en un periodo de tiempo relativamente corto después de la puesta, se pueden encontrar numerosos y diferentes tipos de microorganismos en su superficie, que bajo determinadas condiciones (temperatura de almacenamiento, frescura del huevo, nivel de contaminación ambiental, manipulación, entre otros) pueden entrar al huevo, multiplicarse y causar su deterioro. Además, una humedad elevada favorece en gran medida el desarrollo de microorganismos en la superficie y la consecuente penetración por las membranas internas (Jay et al., 2005). De forma natural, el huevo se encuentra protegido de la contaminación exterior gracias a la barrera física que le proporciona su cáscara y membranas y a barreras químicas antibacterianas presentes en su composición. Sin embargo, es un alimento perecedero debido a la alta susceptibilidad de ser atacado por microorganismos. A pesar de contar con defensas naturales, como agentes antimicrobianos en su interior, de forma habitual adquiere una contaminación microbiana en su cáscara que puede proceder del contacto con heces, de los nidales, de los sistemas colectores hasta el centro de clasificación, o de la manipulación inadecuada, entre otros. Además, influyen otros factores en su contaminación como son la carga microbiana inicial (número y tipo de microorganismo), las condiciones de almacenamiento (humedad, temperatura, composición atmosférica) y factores

intrínsecos del huevo (pH, nutrientes, barreras físicas, e inhibidores de crecimiento) (Hernández, y López, 2010).

II.1.- Microorganismos contaminantes del huevo

Los microorganismos pueden contaminar los huevos en diferentes etapas, desde la producción hasta el consumo. La contaminación transovárica o transmisión “vertical” puede ocurrir cuando los huevos son infectados durante su formación en los ovarios de la gallina. Mientras que la transmisión horizontal se produce cuando son expuestos a un ambiente contaminado y a microorganismos que penetran la cáscara del huevo (De Reu, et al., 2006). Entre los tipos de microorganismos contaminantes del huevo se encuentran bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Staphylococcus*. Entre los mohos generalmente se encuentran los géneros *Mucor*, *Penicillium*, *Hormodendron*, *Cladosporium* y otros. Se han identificado también levaduras del tipo *Torula* en algunos casos (Jay et al., 2005).

II.1.1.- *Salmonella enterica*

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual está formada por bacilos Gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos. Se trata de una bacteria móvil, no formadora de endosporas (D’Aoust y Maurer, 2007). Crece bien en los medios usuales, y presenta la mayor resistencia a las sales biliares y otros componentes químicos dentro de esta familia (Prats y Coll, 1998). El género *Salmonella* se divide en dos especies, *S. enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* se subdivide en seis subespecies, dentro de las cuales se distinguen más de 2600 serovares o serotipos. *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium son los serotipos más comunes causantes de salmonelosis (Tauxe, 1991; Todd, 1996). Existen serotipos que no son móviles, tales como *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Porrero et al., 2006). La mayoría de ellos tienen su reservorio natural en el tubo digestivo de diversos animales, como aves, mamíferos y reptiles y causan enteritis en humanos; otros tienen un reservorio exclusivamente en humanos, como *S. Typhi* y *S. Paratyphi* causantes de la fiebre tifoidea y paratifoidea.

Salmonella enterica es un importante patógeno transmitido por los alimentos, causante de gastroenteritis comúnmente conocida como salmonelosis (Coburn et al., 2007). Los síntomas de la salmonelosis incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea y fiebre (Giannella, 2006; Peques y Miller, 2009). Las cepas con una mayor capacidad invasiva son las de *S. enterica*, que pueden dar lugar a infecciones graves, que requieren tratamiento con antibióticos (EFSA, 2010). El aumento de resistencia a antimicrobianos en especies de *Salmonella* no tifoidea es un grave problema para la salud pública en todo el mundo (Su et al., 2004). Aunque la infección intestinal causada por los serotipos de *Salmonella* no tifoidea es generalmente asintomática, una terapia antimicrobiana eficaz es esencial si se produce una propagación de la bacteria más allá del intestino (Su et al., 2004).

Según los datos de la EFSA y el ECDC (2015), en 2013, *Salmonella* sigue siendo la causa más frecuente de toxiinfecciones de origen alimentario notificadas en la UE (22,5% del total de brotes). En cuanto al número de personas infectadas, la salmonelosis sigue siendo la segunda enfermedad zoonótica más frecuente con 82.694 casos confirmados en seres humanos. Si bien, este valor representa una disminución del 7,9% en la tasa de infecciones declarada por la UE en comparación con el año 2012, los datos de España confirmaron un aumento de 4.224 casos en 2012 a 4.537 en 2013. El hogar es el lugar donde ocurren la mayoría de los brotes de salmonelosis, aunque los lugares asociados a la restauración colectiva también dan lugar a un elevado número de afectados. El principal factor que contribuye a estas toxiinfecciones es la temperatura inadecuada de conservación del alimento, seguido del consumo de alimentos crudos y la preparación de los platos con antelación. La estacionalidad está muy marcada, siendo los meses con temperaturas más elevadas los que presentan una mayor frecuencia de brotes. De las toxiinfecciones alimentarias notificadas en España, un porcentaje considerable se relaciona con el consumo de huevos y derivados, siendo *Salmonella* el agente causal en la mayoría de los casos. El serotipo Enteritidis es el más frecuente, y como vehículo de transmisión más habitual los platos con huevo crudo o poco cocinado.

La transmisión de *Salmonella* ocurre generalmente cuando la bacteria contamina los alimentos durante su preparación o cuando se dan condiciones que permiten su multiplicación en el alimento (por ejemplo por una temperatura inadecuada de almacenaje, cocinado insuficiente, o por contaminación cruzada con alimentos crudos).

Dentro de los alimentos que la pueden transmitir se encuentran la carne, especialmente la de aves de corral, la leche y los huevos crudos (Jorgensen et al., 2002, Mead et al., 1999). Los alimentos más importantes en la salmonelosis de origen alimentario son los huevos y ovoproductos (Gantois et al., 2009; EFSA y ECDC, 2015). La leche y los productos lácteos, incluidos la leche fresca, las leches fermentadas, los helados, y el queso han producido también este tipo de infecciones (Olsen et al., 2004; Silva et al., 2010). También se han descrito casos de salmonelosis tras el consumo de otros alimentos contaminados, como zumos no pasteurizados (Buxton et al., 1999; Parish et al., 1997), pescado (Da Silva et al., 1998, Heintz et al., 2000) cacao, frutas, verduras y mantequilla de cacahuets (Grasso et al., 2010, Park et al., 2008, Lampel et al., 2012). Dado que *Salmonella* es sensible al calor, es más frecuente en los alimentos crudos que no se cocinan a una alta temperatura o a una temperatura mínima.

Los huevos se contaminan con *Salmonella* a partir de los animales infectados, bien mediante transmisión vertical (transovárica) o durante la puesta. En las instalaciones de procesado de huevos, las principales fuentes de contaminación son las superficies de contacto directo e indirecto (por ejemplo, superficies de equipos, envases y otros objetos que entran en contacto directo con los alimentos), agua, aire, así como el personal implicado (Musgrove et al., 2004, 2009). Los equipos de transporte y mantenimiento dentro de la planta, los sistemas de drenaje y de manipulación de residuos también se han identificado como posibles fuentes de contaminación durante el procesamiento (Ayres et al., 1967; Carsberg, 2003; Davies y Breslin, 2003; Moats, 1981). La prevalencia de la bacteria en el ambiente y en los utensilios de las granjas puede ser elevada (Dewaele et al., 2012).

Conscientes de ello, la Organización Interprofesional del Huevo y sus Productos (INPROVO), en colaboración con los Ministerios de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, implantaron un plan de vigilancia y control de *Salmonella* en la producción de huevos con el fin de disminuir la incidencia y la prevalencia de infecciones por *Salmonella* relacionadas con el consumo de huevos, mediante actuaciones de prevención y control (Ortega, 2003). Dentro de este Plan se pusieron en marcha importantes medidas en la producción y comercialización de huevos con la finalidad de garantizar la higiene alimentaria. Cabe destacar la aplicación en las granjas de protocolos de buenas prácticas de higiene, la vacunación obligatoria de las gallinas

ponedoras y la realización de controles en piensos, agua y pollitas de reposición. En los centros de embalaje de huevos y fábricas de ovoproductos se emplea el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) para asegurar que los riesgos sanitarios del proceso están bajo control.

II.1.2.- *Escherichia coli* patógeno

Los huevos pueden actuar como vectores de transmisión de otros microorganismos patógenos. Varios estudios han descrito la posibilidad de transmisión de otras bacterias patógenas como cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) en productos cárnicos de pollo y en huevos (Jakobsen et al., 2010; Mitchell et al., 2015). Las cepas ExPEC representan una especial preocupación en mujeres, recién nacidos, ancianos, e inmunodeprimidos, debido al aumento de casos de infecciones del tracto urinario, meningitis, sepsis abdominal, y septicemias (Mellata, 2013). Estas bacterias también pueden infectar a las aves de granja, provocando pérdidas económicas importantes debidas a la mortalidad de los animales y al desecho de las piezas de carne contaminadas. Una práctica común es el uso de antibióticos en las granjas para prevenir o curar las infecciones por ExPEC, dando como resultado que los productos avícolas se conviertan en una fuente de ExPEC resistentes a antibióticos que pueden provocar infecciones en humanos. A diferencia de las cepas ExPEC, la capacidad de transmisión de *E. coli* diarreogénica (DEC) como fuente de infección en los productos de aves de corral ha sido muy poco estudiada. Entre las cepas patógenas de *E. coli*, además de las ExPEC hay seis clases bien caracterizadas o fenotipos de DEC que pueden causar enfermedad intestinal en los seres humanos (Kaper et al., 2004): *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia inespecífica (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998; Kaper et al., 2004).

Las gallinas tienen una apertura que es común para el intestino, tracto urinario y aparato reproductor, que podría contribuir a la contaminación de la cáscara externa del huevo cuando el huevo pasa a través de esta región. Varios estudios han demostrado la presencia de *E. coli* en la cáscara de huevo en diferentes etapas de la cadena de producción (Chousalkar et al., 2010; Musgrove et al., 2004, 2005, 2008). Se ha descrito también que, en la microbiota fecal de pollos sanos, del 10 al 15% de las cepas de *E.*

coli pueden pertenecer al serotipo-O (Harry y Hemsley, 1965). Diferentes ensayos de laboratorio han demostrado que *E. coli* O157:H7 es capaz de colonizar los intestinos ciegos de pollo tras procesos de eliminación fecal prolongada (Berry et al., 1985). En un estudio sobre la capacidad de producción de toxinas en cepas de *E. coli* procedentes de aves, se describió que eran capaces de producir actividad citotóxica in vitro (Fantanatti et al., 1994), detectándose más tarde la presencia de genes para toxinas termoestables (Chousalkar et al., 2010). Sabemos que el proceso de cocción puede destruir o reducir las bacterias presentes en los huevos, pero también es una práctica común comer huevo ligeramente cocinado. Si el tratamiento térmico es insuficiente, algunas bacterias pueden sobrevivir en el interior del huevo. Por otra parte, los pequeños defectos de la cáscara del huevo pueden proporcionar una vía para que las bacterias en la cáscara del huevo puedan penetrar y pasar al contenido interno (De Reu et al., 2006). Así mismo, cabe la posibilidad de que las enterotoxinas termoestables producidas en los alimentos que contengan huevo contaminado no se inactiven en las posteriores etapas de cocinado.

III.- RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para evitar la transmisión de microorganismos patógenos o alterantes en la cadena alimentaria y mejorar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, se utilizan compuestos como los biocidas, desinfectantes, antisépticos...

III.1.- Biocidas

Debido a los riesgos microbiológicos a los que exponemos a un alimento a lo largo de su proceso de producción, es importante mantener una extrema higiene de todo el entorno que envolverá nuestro producto, superficies, útiles de trabajo, suelos, paredes, techos... Para esta higienización en la industria, se utilizan desinfectantes que se denominan biocidas (Denyer, 1995).

Los biocidas son las sustancias activas y preparados que contengan una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos.

Los biocidas se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios.

- En función de su naturaleza pueden ser:

Biológicos: Son los seres vivos o sus productos que se han demostrado eficaces para combatir los organismos nocivos. Constituyen un grupo heterogéneo parte del cual se encuentra en fase de experimentación. Entre ellos se cuentan especies que se comportan como enemigos naturales o depredadores, insecticidas virales, pesticidas bacterianos y fúngicos, hormonas de la metamorfosis y el crecimiento de los mismos insectos y feromonas que sirven entre los insectos como medio de comunicación y pueden ser manipulados.

Químicos: Naturales: la mayoría son extractos de plantas de tipo alcaloide (estricnina, nicotina) o no (piretrina, rotenona). En general, su uso ha disminuido frente a los productos de síntesis. Sintéticos: son los más utilizados en la actualidad y entre ellos hay que destacar una serie de familias. Compuestos inorgánicos y organometálicos: incluye compuestos de casi todos los metales. Especialmente importantes por su toxicidad son los derivados del As, Ag, Ta, Pb, P y Hg. Compuestos orgánicos: se incluyen aquí diferentes familias de compuestos, como derivados del amonio cuaternario, bisfenoles, biguanidas y poliguanidas, compuestos organoclorados, etc.

- Atendiendo al uso a que van destinados, los biocidas se pueden clasificar en varios grupos principales (Real Decreto 1054/2002, anexo V):

GRUPO PRINCIPAL 1: Desinfectantes y biocidas generales

Estos tipos de productos excluyen los productos de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos y en polvo y productos similares.

Tipo de producto 1: Biocidas para la higiene humana.

Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene humana.

Tipo de producto 2: Desinfectantes utilizados en los ámbitos de la vida privada y de la salud pública y otros biocidas.

Productos empleados para la desinfección del aire, superficies, materiales, equipos y muebles que no se utilicen en contacto directo con alimentos o piensos en zonas de la esfera privada, pública e industrial, incluidos los hospitales, así como los productos empleados como alguicidas. Las zonas de utilización incluyen, entre otras, las piscinas, acuarios, aguas de baño y otras; sistemas de aire acondicionado; paredes y suelos de centros sanitarios y otras instituciones; retretes químicos, aguas residuales, desechos de hospitales, tierra u otros sustratos (en las áreas de juegos).

Tipo de producto 3: Biocidas para la higiene veterinaria.

Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene veterinaria, incluidos los productos empleados en las zonas en que se alojan, mantienen o transportan animales.

Tipo de producto 4: Desinfectantes para las superficies que están en contacto con alimentos y piensos.

Productos empleados en la desinfección de equipos, recipientes, utensilios para consumo, superficies o tuberías relacionados con la producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos, piensos o bebidas (incluida el agua potable) para seres humanos o animales.

Tipo de producto 5: Desinfectantes para agua potable.

Productos empleados para la desinfección del agua potable (tanto para seres humanos como para animales).

GRUPO PRINCIPAL 2: Conservantes

Tipo de producto 6: Conservantes para productos envasados.

Productos para la conservación de productos elaborados que no sean alimentos o piensos, dentro de recipientes, mediante el control del deterioro microbiano con el fin de prolongar su vida útil.

Tipo de producto 7: Conservantes para películas.

Productos empleados para la conservación de películas o recubrimientos mediante el control del deterioro microbiano con el fin de proteger las propiedades iniciales de la superficie de los materiales u objetos como pinturas, plásticos, selladores, adhesivos murales, cubiertas, papeles, obras de arte.

Tipo de producto 8: Protectores para maderas.

Productos empleados para la protección de la madera, desde la fase del aserradero inclusive, o los productos derivados de la madera, mediante el control de los organismos que destruyen o alteran la madera. Se incluyen en este tipo de productos tanto los de carácter preventivo como curativo.

Tipo de producto 9: Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados.

Productos empleados para la conservación de materiales fibrosos o polimerizados, como los productos de cuero, caucho, papel o textiles y la goma mediante el control del deterioro microbiano.

Tipo de producto 10: Protectores de mampostería.

Productos empleados para la conservación y tratamiento reparador de los materiales de mampostería u otros materiales de construcción distintos de la madera mediante el control del deterioro microbiano y la afectación por algas.

Tipo de producto 11: Protectores para líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales.

Productos empleados para la conservación del agua u otros líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y de elaboración industrial mediante el control de los organismos nocivos como microbios, algas y moluscos. No se incluyen en este tipo de productos los empleados para la conservación del agua potable.

Tipo de producto 12: Productos antimoho.

Productos empleados para la prevención o el control de la proliferación de mohos sobre los materiales, equipos y estructuras utilizados en procesos industriales,

por ejemplo sobre la madera y pulpa de papel, estratos de arena porosa en la extracción de petróleo.

Tipo de producto 13: Protectores de líquidos de metalistería.

Productos empleados para la conservación de los líquidos de metalistería mediante el control del deterioro microbiano.

GRUPO PRINCIPAL 3: Plaguicidas

Tipo de producto 14: Rodenticidas.

Productos empleados para el control de los ratones, ratas u otros roedores.

Tipo de producto 15: Avicidas.

Productos empleados para el control de las aves.

Tipo de producto 16: Molusquicidas.

Productos empleados para el control de los moluscos.

Tipo de producto 17: Piscicidas.

Productos empleados para el control de los peces; se excluyen de estos productos los empleados para tratar las enfermedades de los peces.

Tipo de producto 18: Insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos.

Productos empleados para el control de los artrópodos (insectos, arácnidos, crustáceos, etc.).

Tipo de producto 19: Repelentes y atrayentes.

Productos empleados para el control de los organismos nocivos (invertebrados como las pulgas; vertebrados como las aves) mediante repulsión o atracción, incluidos los empleados, directa o indirectamente, para la higiene veterinaria o humana.

GRUPO PRINCIPAL 4: Otros biocidas.

Tipo de producto 20: Conservantes para alimentos o piensos

Productos empleados para la conservación de alimentos o de piensos mediante el control de los organismos nocivos.

Tipo de producto 21: Productos antiincrustantes.

Productos empleados para el control de la fijación y crecimiento de organismos incrustantes (microbios o formas superiores de especies animales o vegetales) en barcos, equipos de acuicultura u otras estructuras acuáticas.

Tipo de producto 22: Líquidos para embalsamamiento y taxidermia.

Productos empleados para la desinfección y conservación de cadáveres animales o humanos o de parte de los mismos.

Tipo de producto 23: Control de otros vertebrados.

Productos empleados para el control de los parásitos.

Los agentes biocidas usados en la industria de alimentos deben cumplir con una serie de características ideales (Tabla 1). Es muy difícil encontrar un agente que cumpla con todas las características mencionadas en la tabla, pero, la diversidad de aplicaciones en la industria (superficies, paredes, uso en manos de manipuladores, etc...) hacen posible diferentes combinaciones de estos (Willians, y Worley, 2000).

En la Tabla 2 se muestran los principales biocidas aceptados en la industria alimentaria, de aplicación en las zonas de procesado, manipuladores o en los productos mismos.

Tabla 1. Características ideales de los biocidas empleados en la industria alimentaria.

- Amplio espectro de acción biocida
- Acción rápida
- Sin olor
- Compatible con una amplia variedad de materiales (sin efecto blanqueador, descolorante, propiedades corrosivas)
- Compatibles con la formulación de componentes (agentes de limpieza, buffers, geles, espumas)
- Solubles en agua y de fácil lavado
- Estables durante su almacenamiento
- Fáciles de usar (diluir, aplicar directamente)
- De uso seguro por el manipulador
- No sean productores de residuos peligrosos que puedan afectar al consumidor
- Sin efectos adversos sobre las características de los productos (sabor, apariencia, textura)
- Atractivos económicamente

Los biocidas son muy utilizados en el saneamiento de la industria alimentaria, líneas de procesado, superficies en la industria alimentaria (Krysinski et al., 1992; Kuda et al., 2008; Ueda y Kuwabara, 2007) y en el control no específico de microorganismos en diferentes condiciones ambientales. También están autorizados para la descontaminación de carne de ave cruda (Food and Drug Administration, 2004), o pueden incorporarse en una gran variedad de materiales en contacto con alimentos tales como tablas de cortar, palillos, contenedores de almacenamiento de alimentos, bolsas de basura, o arena para gatos (Yazdankhah et al., 2006; Kampf y Kramer, 2004). En las instalaciones de procesado de huevos, las bacterias pueden estar expuestas a biocidas durante procesos de limpieza y desinfección. También en las granjas de animales, la persistencia de bacterias entéricas en el ambiente y utensilios (Dewaele et al., 2012) favorece una mayor exposición a biocidas y desinfectantes. La exposición a concentraciones subinhibitorias de desinfectantes, lo que podría ocurrir durante procesos de desinfección y limpieza insuficientes, puede dar lugar a la selección de

cepas con susceptibilidad reducida (Karatzas et al., 2007). La exposición a biocidas puede aumentar la transferencia de tolerancia a biocidas en bacterias de las instalaciones de procesamiento de huevo y también de los utensilios a la superficie del huevo.

Tabla 2. Principales biocidas utilizados en la industria alimentaria.

Zonas o ambientes de procesamiento
- Compuestos de amonio cuaternario
- Iodóforos
- Agentes a base de cloro
Manipuladores
- Compuestos de amonio cuaternario
- Iodóforos
- Clorhexidina
- Polihexametileno biguanida
- Paraclorometaxilenol
- Triclosan
Superficie del producto
- Hipocloritos
- Clorados
- Ácidos orgánicos

Los compuestos del amonio cuaternario (QAC) son cationes lipofílicos que se utilizan frecuentemente como biocidas en las industrias de la acuicultura, la agricultura y de los alimentos, como los desinfectantes de manos y antisépticos, en entornos domésticos y clínicos, como conservantes en la industria cosmética, y como inhibidores de corrosión microbiana en lubricantes y otros productos (Blenkinsopp y Costerton, 1991; Boddie et al., 1997; Hegstad et al., 2010). Entre ellos, el cloruro de benzalconio, se utiliza frecuentemente como desinfectante para el saneamiento de las líneas de procesamiento de alimentos y superficies en la industria alimentaria (Krysinski et al., 1992; Kuda et al., 2008; Ueda y Kuwabara, 2007), como desinfectante y antiséptico clínico (de uso tópico), en centros de salud y hogares domésticos y como conservante

antimicrobiano utilizado a baja concentración (Pernak et al., 1999; Mangalappalli y Korber, 2006). El QAC cloruro de hexadecilpiridinio (cloruro de cetilpiridinio) fue aprobado en 2004 por la FDA de Estados Unidos para la descontaminación de carne de ave cruda (Food and Drug Administration, 2004). El polihexametileno biguanida (PHMG) y sus derivados son miembros de la familia de la guanidina que se han utilizado durante muchos años como antisépticos en la industria alimentaria y en medicina (Rosin et al., 2001). El PHMG se utiliza en diferentes formulaciones para desinfectar las superficies de utensilios e instrumentos en la industria alimentaria (Ueda y Kuwabara, 2007). El triclosán (un bis-fenol) también ha sido muy utilizado, incorporado en una amplia gama de productos, tales como paños de cocina, cajas de comida, cepillos de dientes, geles y jabón líquido para el lavado de manos, plásticos, tablas de cortar, palillos, cortadores de pizzas, contenedores de almacenamiento de alimentos, bolsas de basura o arena para gatos, entre otros (Yazdankhah et al., 2006; Kampf y Kramer, 2004).

Por otro lado existe preocupación sobre el impacto medioambiental generado por el uso extensivo de los biocidas, como el triclosán, ya que se pueden acumular en los lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (Xia et al., 2010). La acumulación de triclosán en el drenaje de aguas residuales puede afectar a las comunidades microbianas y frenar la degradación de xenobióticos (Svenningsen et al., 2011). Lo más preocupante, según los últimos estudios es que el triclosán podría ser un promotor de tumores de hígado (Yueh et al., 2014) y actuar sobre el sistema endocrino (Wang y Tiang, 2015). Por ello, muchas de sus aplicaciones están siendo restringidas o prohibidas, como es el caso de los cosméticos (European Union, 2016).

III.1.1.- Mecanismos de acción de los biocidas

Los biocidas pueden actuar sobre diferentes dianas celulares, como la pared celular, la membrana citoplasmática y el citoplasma, aunque no quiere decir que tengan una acción específica sobre ellas. La acción de los biocidas dependerá del tipo de microorganismos sobre el que queramos actuar, debido a sus diferentes características fisiológicas, metabólicas... (Chapman, 2003). El mecanismo de acción de los biocidas se fundamenta en que actúan sobre las moléculas de la membrana de la célula viva, especialmente sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos (fosfolípidos), ácidos nucleicos

y sobre otras pequeñas moléculas, como algunas vitaminas, hormonas y ciertos elementos minerales esenciales presentes en las células. Al actuar sobre diferentes dianas, es muy difícil determinar cuáles son los efectos concretos que provocan o contribuyen a la muerte del microorganismo.

Los biocidas interactúan en primer lugar con la superficie celular, pero una vez dentro del microorganismo, puede dañar uno o más componentes celulares, mediante tres mecanismos de acción generales (Russel, 1995):

1. Envenenamiento de los sistemas enzimáticos.
2. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular.
3. Coagulación y precipitación de proteínas celulares.

Tampoco todos los biocidas tienen el mismo tipo de efecto sobre los microorganismos, aunque a grandes rasgos hemos descrito los principales mecanismos de acción biocida, cada compuesto tendrá características particulares.

En función de su acción biocida se clasifican como:

- Los **agentes no oxidantes** emplean diferentes mecanismos en su acción biocida. Su acción es generalmente un envenenamiento lento de las células, alterando su metabolismo de alguna forma. Algunos ejemplos son sulfato de cobre, fenoles clorados, óxido de tributil estaño, compuestos de amonio cuaternarios, organosulfuros como el metilbistiocianato, ditiocarbamatos, la propianamida de dibromo nitrilo y otros. Pueden penetrar en la célula y alterar el DNA, el RNA o los sistemas de defensa celulares, por lo cual son los más recomendados (López Aguayo et al., 2010).
- Los **agentes oxidantes** reaccionan con las diferentes moléculas biológicas, inactivándolas. Interfiere con la síntesis proteica en las células, provocando la muerte de los microorganismos. En este grupo están el cloro, bromo, yodo, dióxido de cloro, ozono, peróxido de hidrógeno, junto con algunas sales halógenas y de peróxido. Los biocidas oxidantes tienden a oxidar todo tipo de materia orgánica y se consumen rápido en sistemas muy contaminados. Debido a que los agentes

oxidantes operan por contacto, su aplicación preferencial es en sistemas limpios, bajo condiciones de tratamiento que aseguren mantenerse limpios para que la acción biocida se mantenga efectiva. La acción de los oxidantes sobre la biopelícula es únicamente en la superficie, manteniendo el interior de esta masa microbiológicamente activa. El uso de oxidantes conjuntamente con tensoactivos incrementa su efectividad sustancialmente a un costo relativamente bajo.

III.1.2.- Tolerancia o resistencia a los biocidas

Los biocidas desempeñan un papel muy importante en el control de microorganismos patógenos. La industria alimentaria depende de ellos, y su uso es cada vez mayor. A través de la cadena alimentaria, las bacterias se exponen continuamente a procesos de desinfección que incluyen el uso de biocidas, agentes a los que pueden llegar a ser resistentes. Una de las preocupaciones acerca de la amplia utilización de los biocidas es el hecho de que la adaptación bacteriana tras la exposición a los biocidas puede aumentar también la resistencia a los antibióticos (Condell et al., 2012; Ortega-Morente et al., 2013; SCENIHR, 2009).

A la hora de trabajar con biocidas habrá que tener en cuenta la concentración mínima inhibitoria que tiene cada uno, frente a un microorganismo específico (Russel y McDonnell, 2000). Este parámetro, definirá la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano que tiene cada biocida. La repuesta de crecimiento de un microorganismo a un biocida puede ser muy variada, se puede ver inhibido en presencia de éste o bien comportarse de una forma normal, en cuyo caso estaríamos hablando de un fenómeno de resistencia.

En función del autor que consultemos, podemos definir resistencia, como la supervivencia de una cepa bacteriana a una concentración de biocida que matará el resto de las poblaciones bacterianas. En condiciones de laboratorio, el término resistencia se utiliza generalmente para definir una cepa bacteriana que sobrevive a concentraciones de un biocida que inhibe al resto de la población (Russel, 2004). La tolerancia se define como la inhibición de un microorganismo sin causarle la muerte. El término no susceptible se utiliza para definir a un microorganismo que es resistente a un biocida.

En la práctica, la resistencia se podría definir como la supervivencia bacteriana frente a un biocida usando las concentraciones normalmente recomendadas por el fabricante.

Existen dos tipos de mecanismos de resistencia a biocidas:

- Resistencia intrínseca: tiene lugar cuando no produce efecto alguno sobre el microorganismo a concentraciones elevadas de biocida, es decir, el biocida es incapaz de alcanzar la diana celular. Esto ocurre en gran medida por impermeabilidad de la bacteria al biocida. Este mecanismo es un resultado de la adaptación fisiológica o fenotípica del microorganismo (Kenneth et al., 2002).
- Resistencia adquirida: aparece como consecuencia de una mutación o por adquisición de elementos genéticos externos, como plásmidos o transposones.

Con frecuencia se observa que, tras una exposición prolongada, las bacterias pueden adaptarse a los biocidas, desarrollando tolerancia a los mismos (Cerf et al., 2010; Ortega Morente et al., 2013; Poole, 2002). Las bacterias pueden adaptarse a los biocidas por diferentes mecanismos, entre ellos alterando la permeabilidad celular, por modificación de la diana celular, o por activación de los sistemas de exporte (Russell, 1995; Webber y Piddock, 2003; Poole, 2005; Poole, 2007; Ortega-Morente et al., 2013).

III.2.- Antibióticos

Los antibióticos son productos metabólicos naturales de los hongos, los actinomicetos y otras bacterias, que matan a otros microorganismos o inhiben su crecimiento. La producción de antibióticos en particular se asocia con los microorganismos del suelo y se piensa que en el ambiente natural proporcionan una ventaja selectiva a los microorganismos en su competición por el espacio y los nutrientes. Aunque la mayor parte de los agentes antibacterianos y antifúngicos que se utilizan en clínica hoy en día derivan de productos naturales de la fermentación, la mayor parte de ellos se han modificado mediante procedimientos clínicos para mejorar sus propiedades antibacterianas a farmacológicas. Sin embargo, algunos agentes son totalmente sintéticos (por ejemplo, sulfamidas y quinolonas). Por tanto, a menudo prefiere

utilizarse el término agente “antibacteriano” o “antimicrobiano” en lugar de “antibiótico”.

Existen tres formas de clasificar los agentes antibacterianos:

- Por su acción bactericida o bacteriostática
- Por su mecanismo de acción
- Por su estructura química

Algunos agentes antibacterianos matan las bacterias (bactericidas), mientras que otros sólo inhiben su crecimiento (bacteriostáticos). Los agentes bacteriostáticos son útiles para el tratamiento de las infecciones porque evitan que la población bacteriana aumente, con lo que los mecanismos de defensa del huésped pueden enfrentarse a la población estática. En los pacientes inmunodeprimidos, los fármacos bacteriostáticos pueden ser menos eficaces.

Existen cuatro mecanismos de acción principales. Si nos fijamos en la diana celular, no podemos hacer una predicción precisa de qué antibacterianos serán activos frente a determinadas especies bacterianas, pero sí ayuda a comprender la base molecular de la acción antibacteriana y, a la inversa, facilita la aclaración de muchos de los procesos biosintéticos de las células bacterianas. Las cuatro dianas principales son: la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas, la síntesis de ácidos nucleicos, y la membrana celular. Estas dianas difieren en menor o mayor grado de sus homólogas en las células huésped (humanas) y por ello permiten inhibir la célula bacteriana sin actuar sobre las dianas de la célula del mamífero (toxicidad selectiva). Cada diana engloba una multitud de reacciones sistémicas (enzimas y sustratos), cada una de las cuales puede inhibir de forma específica un agente antibacteriano. Una amplia variedad de moléculas diversas desde el punto de vista clínico pueden inhibir reacciones diferentes sobre la misma diana (por ejemplo, inhibidores de la síntesis de proteínas).

En cuanto a su estructura química, los agentes antibacterianos son muy diversos (Tabla 3). La clasificación basada sólo en la estructura química no es práctica debido a esta diversidad. No obstante, la clasificación de los agentes antimicrobianos en familias atendiendo a su estructura química es importante no sólo para predecir su mecanismo de

acción, sino que también tiene implicaciones considerables en el desarrollo de resistencias cruzadas.

Tabla 3. Clases de antibióticos y quimioterápicos según su estructura química (Bbosa et al., 2013).

Clases de antibióticos/antibacterianos	Ejemplos
β -Lactámicos - penicilinas y cefalosporinas	Penicilina, amoxicilina; ceftiofur
Macrólidos y lincosamidas	Tilosina; tilmicosina; tulatromicina, lincomicina
Aminoglucósidos	Gentamicina, estreptomina, neomicina, espectinomicina
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina
Tetraciclinas	Tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina
Sulfonamidas	Sulfacitina, sulfisoxazol, sulfametizol, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfapiridina
Estreptograminas	Virginiamicina
Polipéptidos	Bacitracina
Fenicoles	Florfenicol
Pleuromultilinas	Tiamulina
Bambermicinas	Bambermicina (Amprolium ^R)
Quinoxalinas	Carbadox
Aminocumarinas	Novobiocina, clorobiocina y cumermicina A1

III.2.1.- Resistencia a antibióticos

La resistencia a los agentes antibacterianos es una cuestión de grado. En el contexto médico, un microorganismo resistente es aquel al que un agente antibacteriano no inhibirá o matará a las concentraciones del fármaco que pueden obtenerse en el cuerpo tras una dosis normal. Algunas especies bacterianas son intrínsecamente resistentes, es decir, que toleran de forma innata a algunas familias de antibióticos bien porque crecen de una diana sensible o porque son impermeables al agente antibacteriano. Los bacilos Gram negativos gracias a su membrana externa son menos permeables a las moléculas grandes que las células Gram positivas. No obstante, entre las especies sensibles de forma innata pueden aparecer también cepas que desarrollen o adquieran resistencias.

Se ha demostrado que las bacterias presentan una gran tendencia a desarrollar resistencia a cada agente nuevo que se introduce (Russel, 2003). Debido a la incidencia cada vez mayor de resistencia, asociada con una menor velocidad de desarrollo de agentes antibacterianos nuevos para combatir las cepas resistentes, se reconoce ahora en todo el mundo una seria amenaza al tratamiento de infecciones que ponen en peligro la vida.

Esta resistencia puede deberse a una sola mutación cromosómica en una célula bacteriana que da lugar a la síntesis de una proteína alterada, o una serie de mutaciones. Las bacterias son también capaces de adquirir genes de resistencia presentes en plásmidos transmisibles. Estos plásmidos a menudo codifican determinantes de resistencia frente a varias familias no relacionadas de agentes antibacterianos. Por tanto, una célula puede adquirir resistencia frente a muchos fármacos diferentes de una sola vez. Esta también conocida como “resistencia contagiosa” fue descrita por primera vez por investigadores japoneses en cocos Gram positivos, pero ahora se sabe que es generalizada en el mundo de las bacterias. Los genes de resistencia pueden aparecer también en transposones, los también denominados “genes saltadores”, que son capaces de integrarse en el cromosoma o en los plásmidos. El cromosoma proporciona una opción más segura para los genes, pero se diseminará sólo con la rapidez con que se divide la bacteria.

Mecanismos específicos de resistencia a los agentes antimicrobianos (Blair et al., 2015; Tenover, 2006):

- Reducción de la entrada del compuesto a la célula o su bombeo activo al exterior.

- Alteración del sustrato al cual se une el agente antimicrobiano

- Modificación covalente del agente antimicrobiano, haciendo que pierda su actividad

- Producción de moléculas que actúan como inhibidores competitivos.

III.3.- Aplicaciones de los antibióticos en el sector agroalimentario

III.3.1.- Uso de agentes antimicrobianos en el tratamiento de animales

Los agentes antimicrobianos (quimioterápicos, antibióticos) se han utilizado en animales en todo el mundo desde hace más de 50 años, generando muchos beneficios en la producción animal y en el desarrollo económico (Flynn, 2012). Son varios los agentes antimicrobianos que se utilizan a nivel mundial en el tratamiento de muchas enfermedades bacterianas de animales, especialmente en aquellos destinados a la producción de alimentos. Muchos de estos agentes se utilizan al mismo tiempo para el tratamiento de infecciones bacterianas en seres humanos (Tabla 4) (Bbosa et al., 2013, 2014; Flynn, 2012; FDA, 2010; Allen y Stanton, 2014). Sin embargo, existe un uso abusivo de estos medicamentos en el sector agroalimentario, donde muchos productores los utilizan sin consultar con un profesional. El problema es aún peor en países subdesarrollados donde se han privatizado los servicios veterinarios haciendo que el costo de los tratamientos sea muy caro para los agricultores. Muchos agricultores utilizan estos agentes y tratan a sus animales incluso en los casos en que el uso de antimicrobianos es innecesario. Como resultado de esto, se liberan cantidades masivas de antimicrobianos al medio ambiente, lo que aumenta la selección de microorganismos resistentes a los antibióticos que pueden propagarse, especialmente las zoonosis bacterianas, aumentando así el coste de los tratamientos tanto en animales como en seres humanos (Kümmerer, 2009; Martinez, 2009). Es probable que el problema aumente de forma global, con graves consecuencias similares a la situación vivida en la edad de oro pre-antibiótica.

Tabla 4. Antimicrobianos aprobados por la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos como aditivos en alimentación para pollos, pavos, ganado vacuno y porcino^{ab} (Allen y Stanton, 2014).

Antimicrobianos	Usos/terapia ^c
Clopidol, narasina, nicarbazina, robenidina, salinomycin, semduramicina	Previene la coccidiosis (C)
Decoquinate	Previene la coccidiosis (C, BC)
Diclazuril, halifuginona zoaleno	Previene la coccidiosis (C, T)
Amprolium	Previene la coccidiosis (C, T, BC, DC)
Lasalocid	Previene la coccidiosis (C, T, BC), Aumento de peso / eficacia en la alimentación (BC)
Clopidol	Previene la leucocitoozoonosis (<i>Leucocytozoon smithii</i>) (T)
Bacitracina (BMD) Bacitracina (Zn)	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, T, S) Aumenta la producción de huevos (C) Ayuda a prevenir / controlar la enteritis (C,T) Tratamiento de enfermedades respiratorias crónicas (sacculitis) y cresta azul (C) Control de la disentería porcina, enteritis por clostridio: (S) Reducción de abscesos hepáticos (BC) Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, T, S, BC)
Bambermicina	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, T, S, BC)
Carbadox	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (S) Control de la disentería porcina (<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>), y enteritis (salmonellosis) (S)
Clorotetraciclina	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, T, S, BC) Controla la sinovitis infecciosa (micoplasmas) (C, T) Control de las enfermedades respiratorias: sacculitis aérea (C), fiebre (BC), neumonía por <i>Pasteurella</i> (S) Reduce la mortalidad en infecciones por <i>Escherichia coli</i> (C) Control de la hexamitiasis y cresta azul (T) Control de anaplasmosis: infección por <i>Anaplasma marginale</i> (BC) Reduce la mortalidad en infecciones por <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium (T) Disminuye la incidencia de abscesos en la mandíbula (<i>Streptococcus</i> grupo E); leptospirosis (S) Tratamiento y control de enteropatías bacterianas: <i>Lawsonia intracellularis</i> (S), <i>E. coli</i> (BC, S)
Florfenicol	Control de enfermedades respiratorias (S)
Laidlomycin	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (BC)

Antimicrobianos	Usos/terapia ^c
Lincomicina	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, S) Tratamiento y control de la disentería porcina (<i>B. hyodysenteriae</i>) (S), y la ileitis proliferativa por <i>Lawsonia</i> . Reduce la gravedad de la neumonía por micoplasmas (S)
Monensina	Previene la coccidiosis (C, T, BC) Aumento de peso / eficacia en la alimentación(BC) Aumenta la eficacia en la producción de leche (DC)
Neomicina/ oxitetraciclina ^e	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, T, S) Control de la sinovitis infecciosa, cólera en aves y enfermedades respiratorias crónicas, sacculitis (<i>Mycoplasma</i> y <i>E. coli</i>) (C) Control de hexamitiasis (<i>Hexamita meleagridis</i>) y sinovitis infecciosa (<i>Mycoplasma synoviae</i>) (T) Tratamiento de enteritis bacteriana, y neumonía Control de la colibacilosis (<i>E. coli</i>) (S, BC) Control y tratamiento de la leptospirosis (S) Aumento de peso / eficacia en la alimentación (BC) Reduce los abscesos hepáticos (BC) bacteriana Control colibacilosis (<i>E. coli</i>) (S, BC) Control and treat leptospirosis (S)
Penicilina	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, T, S)
Roxarsone ^f	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, T) Tratamiento de la disentería porcina (<i>B. hyodysenteriae</i>) (S)
Sulfadimetoxina or metoprima	Previene la coccidiosis (C, T) Ayuda a prevenir la coriza infecciosa (<i>Haemophilus gallinarum</i>), colibacilosis (<i>E. coli</i>), y cólera en aves (<i>Pasteurella multocida</i>) (C, T)
Tiamulina	Control de la disentería porcina (<i>B. hyodysenteriae</i>), e ileitis proliferativa (<i>L. intracellularis</i>) (S)
Tilmicosina	Control de enfermedades respiratorias (S, BC, BD)
Tilosina	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (C, S) Ayuda en el control de enfermedades respiratorias crónicas (C) Control de la disentería porcina (<i>B. hyodysenteriae</i>) e ileitis proliferativa (<i>L. intracellularis</i>) (S) Reduce los abscesos hepáticos (BC)
Tilosina/sulfametazina	Menor incidencia y gravedad de la rinitis atrófica (<i>Bordetella bronchiseptica</i>) (S) Previene la disentería porcina (<i>B. hyodysenteriae</i>) Control de neumonías bacterianas (<i>P. multocida</i> , <i>Arcanobacterium pyogenes</i>) Reduce la incidencia de abscesos en la mandíbula (<i>Streptococcus</i> grupo E)
Virginiamicina	Aumento de peso / eficacia en la alimentación (excepto en gallinas ponedoras) (C, T, S, BC) Previene la enteritis necrótica (<i>Clostridium perfringens</i>) (C) Control y tratamiento de la disentería porcina (<i>B. hyodysenteriae</i>) (S) Reduce los abscesos hepáticos (BC)

^a Abreviaturas: BC, Ganado vacuno; BMD, bacitracina metilén disalicilato; C, pollo; DC, vacas lecheras; S, cerdo; T, pavos.

^b Adaptado del Compendio de Aditivos Alimentarios 2012 (11). La lista se limita a compuestos con actividad antimicrobiana. Es decir, que tienen propiedades antibacterianas o antiprotozoarias (por ejemplo, coccidianas).

^c La aprobación del uso (cantidades y duración) de cualquier medicamento depende de la especie animal, el peso corporal (etapa de crecimiento), la edad, la combinación con otros fármacos, aplicación y restricciones (tiempos de retirada antes del envío al mercado).

^d No apto para uso en la producción de huevos de aves de corral; la oxitetraciclina está aprobada para tratamientos similares pero con menor número de aplicaciones que la clorotetraciclina.

^e La mayoría de los antimicrobianos en la tabla están aprobados para su uso combinado con otros dos o tres antimicrobianos con diferentes espectros de actividad y para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, la tilosina más la sulfametazina es una combinación aprobada para tratar varias enfermedades porcinas.

^f La roxarsona es un compuesto organo-arsénico cuyo uso está prohibido debido a la detección por parte de la Food and Drug Administration de altos niveles de arsénico inorgánico en piensos de engorde para pollos.

III.3.2.- Uso de agentes antimicrobianos en alimentación animal

Las industrias de elaboración de piensos y los agricultores han estado utilizando antibióticos en la alimentación del ganado desde 1946, después de que se comprobara que el consumo de antibióticos hacía que los animales crecieran más rápido y aumentaran de peso en poco tiempo (EFSA, 2011; Chee-Sanford et al., 2013).

La mejora del valor nutricional de los alimentos para animales mediante el uso de antibióticos se descubrió al suplementar las dietas a base de vegetales con productos o subproductos microbianos (Gustafson y Bowen, 1997; Jukes, 1977). El empleo de materias vegetales (soja, maíz) en los piensos permitió usar recursos más baratos en tiempos de guerra en comparación con otros suplementos más caros procedentes de proteína animal (como por ejemplo, la harina de pescado). Sin embargo, los piensos basados en vegetales carecían de vitaminas como la vitamina B y de aminoácidos esenciales como la metionina. Jukes et al., (1950) en los laboratorios Lederle

descubrieron que los subproductos finales resultantes de la producción a gran escala de clorotetraciclina (Aureomicina) mediante el cultivo de *Streptomyces aureofaciens* eran tan eficaces como los extractos de hígado de animales para mejorar el crecimiento de pollitos deficientes en vitamina B12. Después de que un primer informe demostrara que la estreptomicina o el sulfatiazol (Sulfasuxidina) aumentaban la tasa de crecimiento en pollitos (Moore et al., 1946), se demostró también que la aureomicina purificada y la penicilina tenían efectos beneficiosos en el crecimiento de pollitos y cerdos (Jukes, 1977; Luecke et al., 1951).

Los beneficios comerciales asociados al empleo de antibióticos para mejorar la eficiencia de la alimentación animal dieron lugar a una avalancha de solicitudes de patentes de promotores del crecimiento. Entre las más destacadas se incluyen el concentrado de clorotetraciclina presentado por American Cyanamid (Jukes, 1952), la penicilina por Merck (Ott, 1956), la oxitetraciclina por Pfizer (Pfizer, 1954), la kanamicina por Bristol (Bristol Lab. Int., 1960), la espiramicina por Rhone-Poulenc (Rhone, 1961), el combinado de tetraciclina, sulfonamida y penicilina por American Cyanamid (Harvey, 1965), o los preparados a base de dióxidos de quinoxalina (carbadox, Mecadox) por Pfizer (Pfizer, 1970). Se encontró que los antibióticos ionóforos aumentan la eficiencia de la alimentación en rumiantes (ovejas, cabras, vacuno), lo que motivó las patentes de monensina, dianemicina y nigericina por Eli Lilly & Co. (Raun, 1974).

Se ha descrito que más del 80% de todos los antibióticos producidos a nivel mundial se utilizan en animales, y algunos se utilizan también en acuicultura para controlar las enfermedades bacterianas de los peces y otros animales acuáticos (Kümmerer, 2009; WHO, 2011). Los antimicrobianos provocan cambios en los procesos fisiológicos, nutricionales y metabólicos de los animales. Se utilizan con diversos fines (Giguère, 2006; Graham et al., 2007; Bbosa et al., 2013): (1) estimulación de la síntesis intestinal de vitaminas por bacterias; (2) reducción del número total de bacterias (flora normal) en el tracto gastrointestinal, lo que reduce la competencia entre los microorganismos y el hospedador por los nutrientes; (3) inhibir a las bacterias perjudiciales, que pueden ser ligeramente patógenas o productoras de toxinas; (4) inhibición de la ureasa bacteriana; (5) mejora de la eficiencia energética del intestino; (6) inhibición de la actividad de la colitaurina hidrolasa bacteriana; (7) ahorro de

nutrientes; (8) mejora de la farmacocinética de los nutrientes, especialmente a nivel del epitelio del intestino delgado; (9) modificación de la actividad enzimática intestinal; (10) disminución de la estimulación inmune debida al estrés causado por el hacinamiento de los animales; (11) modificación del metabolismo microbiano del rumen (Giguère, 2006; Graham et al., 2007).

En Estados Unidos, en 2014, las ventas y distribución (nacionales y de exportación) de antimicrobianos aprobados para su uso en animales destinados a la producción de alimentos fue de aproximadamente 15,4 millones de kilogramos (FDA, 2015). Las ventas y distribución a nivel nacional en este mismo concepto fueron aproximadamente 15,36 millones de kilogramos (aproximadamente el 99,99%), mientras que las ventas y distribución de exportación fueron de aproximadamente 31 mil kilogramos (<1%). Las tetraciclinas representaron el 43% y los ionóforos el 31% de las ventas nacionales. Las tetraciclinas representaron el 22% de las ventas de exportación. En China, se producen anualmente cerca de 210.000 toneladas de antibióticos, casi la mitad de los cuales se utilizan en ganadería para prevenir enfermedades y mejorar la producción (Hvistendahl, 2012; Luo et al., 2011). En Alemania, en el año 2011 se utilizaron 1.734 toneladas de agentes antimicrobianos para uso en animales, en comparación con 800 toneladas utilizadas para los seres humanos. En 2012, la India fabricó cerca de un tercio de la cantidad total de antibióticos en el mundo. Estas cifras nos dan una idea del grado de exposición a agentes antimicrobianos a que son sometidos los microorganismos en la cadena alimentaria.

La Unión Europea comenzó a prohibir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento a finales de los años noventa. Dinamarca lideró la aplicación de esta norma con una prohibición total en el año 2000. Pero los oponentes, incluido el Instituto de Salud Animal, señalan que el efecto final no ha sido el deseado, ya que el uso de antibióticos para tratar enfermedades agudas de animales en Dinamarca ha aumentado, al igual que las muertes de animales por infecciones bacterianas.

En 2012, la FDA de los Estados Unidos dio a conocer una nueva guía que pide el "uso juicioso" de los antibióticos en las granjas. La agencia desalentó el uso de antibióticos como promotores del crecimiento y pidió cambios en la etiqueta de estos medicamentos y más supervisión veterinaria para su aplicación. No todas las directrices

están aprobadas todavía y el cumplimiento es voluntario. Sin embargo, la agencia ha sugerido que aplicará reglas más duras si los agricultores y los fabricantes de antibióticos no adoptan las directrices en unos tres años. La FDA está tomando medidas para promover el uso juicioso de antimicrobianos de importancia médica en la cría de animales. El primer documento, *New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209* (FDA, 2013, Guidance #213), proporciona orientación a las compañías farmacéuticas para que revisen voluntariamente las condiciones de uso especificadas en el etiquetado aprobadas por la FDA para a) eliminar el uso de antimicrobianos para incrementar la producción animal; b) cuando sea necesario aplicar tratamiento para el control o la prevención de enfermedades, hacerlo con un respaldo científico; y c) someter la comercialización de los antimicrobianos que actualmente se venden libremente a la Directiva Veterinaria de Piensos en el caso de antimicrobianos que se administran con los piensos, o bien a prescripción veterinaria para aquellos que se administran con el agua, de forma que siempre exista supervisión por un veterinario. En junio de 2015, la FDA publicó la regla final de la Directiva Veterinaria de Piensos (FDA, 2015), una pieza importante de la estrategia general de la agencia para promover el uso racional de antimicrobianos en animales destinados a la producción de alimentos. Esta estrategia llevará el uso de estos fármacos bajo supervisión veterinaria para que se utilicen sólo cuando sea necesario para asegurar la salud animal.

En contraposición a las directivas adoptadas por la Unión Europea y las propuestas por la FDA, se conoce muy poco sobre las normativas que se aplican en otros países productores de carne. Por ejemplo, China, que mantiene la mitad de la población mundial de cerdos, todavía tiene que controlar el uso de antibióticos en las granjas.

III.4.- Impacto del uso de antibióticos en el desarrollo de resistencias en animales productores de alimentos

Cabría pensar que el principal impacto del uso de antibióticos en la microbiota intestinal de los animales ha sido la evolución de cepas resistentes a antibióticos. La resistencia a

los antibióticos, sin embargo, no se originó como consecuencia del uso de los antibióticos en el sector agroalimentario. La resistencia a los antibióticos es un rasgo bacteriano antiguo, existente en las bacterias del suelo (el resistoma del suelo) y que se ha mantenido en plásmidos (por ejemplo, serina β -lactamasas) así como en los cromosomas bacterianos durante millones de años antes de que comenzara la agricultura (Allen et al., 2010; Aminov, 2009; Martinez, 2012). Los análisis filogenéticos llevaron a Aminov y Mackie (2007) a concluir que hay múltiples linajes para la resistencia a antibióticos naturales como eritromicina, vancomicina, ciertas β -lactamas y tetraciclinas. Las bacterias del medio ambiente son las fuentes progenitoras más cercanas de los genes de resistencia a antibióticos que ahora se encuentran en los ámbitos de la clínica humana y veterinaria y que prevalecen en los animales de granja (Aminov y Mackie, 2007).

El uso de antibióticos en los animales de granja ha tenido un tremendo impacto en el desarrollo de resistencias (Aarestrup, 1999; Allen y Stanton, 2014; Marshall y Levy, 2011). Al igual que los aislados clínicos resistentes a antibióticos aparecieron rápidamente en los seres humanos (Aminov y Mackie, 2007), también aparecieron bacterias resistentes a los antibióticos en animales de granja tratados con antibióticos (Dibner y Richards, 2005). En 1951 se encontraron coliformes resistentes a estreptomicina en pavos alimentados con ese antibiótico (Dibner y Richards, 2005). De igual modo, se detectaron cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a la clorotetraciclina poco después de haber suministrado este antibiótico a los animales (Elliott y Barnes, 1959). El suministro de antibióticos a los animales también incrementó la diversidad taxonómica y la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos en las granja y sus alrededores. H.W. Smith estimó que la mayoría de los aislados de *E. coli* procedentes de cerdos en manada en el Reino Unido se habían vuelto resistentes a la tetraciclina después de 18 años de alimentación con este antibiótico (Smith, 1970). También se encontraron lactobacilos y enterococos resistentes a tetraciclinas en cerdos de granja alimentados con este antibiótico (Fuller et al., 1960). En un análisis retrospectivo sobre 1.729 aislados de *E. coli* recogidos de humanos, ganado vacuno, pollos y cerdos entre 1962 y 2002, Tadesse y colaboradores (Tadesse et al., 2012) detectaron aumentos significativos en la resistencia a 11 de los 15 antibióticos ensayados, incluyendo resistencias a ampicilina, tetraciclina, kanamicina y sulfonamidas. Los aumentos en las resistencias a gentamicina, kanamicina y

trimetoprima / sulfametoxazol fueron más comunes en las cepas de *E. coli* procedentes de animales que en las de seres humanos. Por otra parte, un reciente análisis de suelos agrícolas en los Países Bajos reveló que los niveles de genes de resistencia aumentaron con el tiempo desde la era preantibiótica (años 40) hasta el 2010 (Knapp et al., 2010). Finalmente, se ha encontrado que cepas de la familia *Enterobacteriaceae* de origen humano de colecciones de cultivo anteriores a la era antibiótica contienen plásmidos conjugativos que carecen de genes de resistencia, lo que indica que la transferencia de genes de resistencia aún no había comenzado (Hughes y Datta, 1983).

Una consecuencia del uso indiscriminado de antibióticos es la existencia de un fondo genético de resistencias elevado y complejo en las bacterias asociadas a la industria alimentaria. Un estudio de 2007 determinó que los psicrotrofos aislados a partir de la leche, incluyendo *P. fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* así como un número de psicrotrofos no identificados, presentan resistencia a varios antibióticos β -lactámicos y no β -lactámicos. Este rasgo parece aumentar a lo largo de la cadena de transporte de la leche cruda (Munsch-Alatossava y Alatossava, 2007). Las bacterias del género *Acinetobacter* aisladas de leche cruda también han mostrado resistencia a antibióticos (Gurung et al., 2013). Estas bacterias están muy extendidas en la naturaleza, incluyendo el suelo y el agua, y son patógenos oportunistas en los seres humanos. Las cepas multiresistentes de esta bacteria son una grave preocupación a nivel hospitalario (Dijkshoorn, 2013).

Aunque los lactococos, los enterococos y los lactobacilos son intrínsecamente resistentes a algunos antibióticos (Mathur y Singh, 2005), las cepas de estos que se encuentran en los alimentos suelen ser bastante sensibles a los antibióticos clínicamente importantes como la ampicilina, penicilina, gentamicina y vancomicina (Mannu et al., 2003, Herreros et al., 2005, Mathur y Singh, 2005). Además, las cepas de *Leuconostoc* son generalmente sensibles a los antibióticos (Swenson et al., 1990). No obstante, a partir de leche cruda se han aislado BAL resistentes a antibióticos, como *L. lactis* con resistencia a la tetraciclina, clindamicina y eritromicina y *L. garvieae* con resistencia a tetraciclina, estreptomicina y quinupristina-dalfopristina (Flórez et al., 2008, 20012; Flórez y Mayo, 2015; Walther et al., 2008).

El uso de antibióticos en animales de granja puede agravar esta cuestión promoviendo el desarrollo de resistencia a los antibióticos entre los microorganismos presentes en la cadena alimentaria (en particular en la leche de vaca) y exponiendo a los consumidores a los residuos de antibióticos en la leche y en otros productos lácteos (Doyle et al., 2013). Existe una preocupación creciente sobre el incremento de cepas resistentes o multirresistentes a los agentes antimicrobianos en la cadena alimentaria (EFSA, 2010; EFSA-ECDC, 2013b; ECDC, 2012, 2013). El uso de antibióticos para tratar la mastitis durante la lactancia es común, ya que entre el 2% y el 55% de las vacas padecen mastitis durante este período (Kelton et al., 1998). En particular, las cepas bacterianas asociadas con la mastitis bovina, incluyendo muchas cepas de *S. aureus*, han demostrado resistencia a antibióticos como penicilinas, oxitetraciclina, estreptomina y / o gentamicina (Thaker et al., 2013). La detección de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina en leche cruda (Riva et al., 2015) es de gran preocupación. Estos problemas pueden reducirse prohibiendo la venta de leche de vacas que tienen mastitis y están siendo tratadas con antibióticos y durante un período de tiempo obligatorio después del tratamiento con antibiótico. La legislación introducida por el Codex Alimentarius 2009 y el Reglamento 37/2010 / CE del Consejo de la Unión Europea, exigen un control de la presencia de antibióticos en la leche y establecen los límites máximos de residuos de antibióticos en leche para uso comercial.

En productos avícolas, existen numerosos estudios que han demostrado una alta prevalencia de cepas de *Salmonella* resistentes a diversos agentes antimicrobianos (Álvarez-Fernández et al., 2012; Adesiyun et al., 2007; Antunes et al., 2003; Arvanitidou et al., 1998; Duffy et al., 1999; Soufi et al., 2012). En un estudio reciente (Lamas et al., 2016) sobre cepas de *Salmonella* aisladas de granjas de pollos en España entre 2011 y 2015, se encontró que el 59,70% de las cepas eran resistentes al menos a uno de los antibióticos ensayados, y que el 19,70% eran multirresistentes. Los niveles más altos de resistencias se detectaron para sulfametoxazol (40,29%), doxiciclina (17,91%) y nalidíxico (17,91%). Así mismo, se han encontrado cepas de *E. coli* aisladas de cáscara de huevo con resistencias a antibióticos como tetraciclina y estreptomina (Musgrove et al., 2006). En el período 1992-1993, el 7% de cepas de *E. coli* procedentes de pollos sanos en España eran resistentes a la ciprofloxacina (Blanco et al., 1997). En otro estudio sobre resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de heces de pollos de engorde en España se encontraron porcentajes muy elevados de

resistencia al ácido nalidíxico (88%) y tetraciclina (75%), seguido de otros antimicrobianos como trimetoprim-sulfametoxazol (65%), ampicilina (58%), o ciprofloxacina (38%), y cloranfenicol (12%) (Sáenz et al., 2001).

En *Salmonella*, la resistencia a antibióticos está a menudo asociada a integrones o a plásmidos que facilitan su diseminación (Mulvey et al., 2006; Fábrega y Vila, 2013). El fenotipo multirresistente ASSuT (ampicilina, estreptomicina, sulfamidas, tetraciclina) está ampliamente diseminado, y sus determinantes genéticos se encuentran agrupados en casetes dentro de integrones como los pertenecientes a la clase I (Caleja et al., 2011; de Toro et al., 2011). Los integrones de la clase I se caracterizan por presentar dos segmentos conservados (5'CS y 3'CS), un gen para la integrasa (*intI1*) y varios genes para resistencia a diferentes tipos de antibióticos (como *bla*, *aadA*, *dfrA*, *str*, *tet*, y a veces otros como *floR*, *cmlA*, *aac(6')-Ib-cr*, *aadA* o *aphA-1AB*). Los integrones de la clase I se asocian a la isla genómica de patogenicidad I, como es el caso del serotipo DT104. El serotipo DT104 (y sus variantes) está ampliamente distribuido en animales de granja como vacas, cerdos, ovejas y aves. Así mismo, se ha demostrado que estas cepas son más virulentas en modelos de experimentación, y su amplia distribución sugiere que podrían tener también una mayor capacidad de adaptación (Levings et al., 2005; Mulvey et al., 2006; Golding et al., 2007). La presencia de islas de patogenicidad en otras enterobacterias ha sido mucho menos estudiada, y se sospecha que algunas de ellas, como el género *Enterobacter* podrían actuar como reservorios de resistencia a antimicrobianos en los animales de granja y en sus productos.

Algunos determinantes de resistencia a antimicrobianos, como beta-lactámicos, quinolonas y fluoroquinolonas, pueden ir asociados a plásmidos. Los plásmidos de resistencia a fluoroquinolonas están ampliamente diseminados en Enterobacterias, y se asocian con frecuencia a la resistencia a beta-lactámicos en cepas con fenotipos multirresistentes (Crémet et al., 2011). Algunos genes, como la variante *aac(6')-Ib-cr*, confieren resistencia de forma simultánea a aminoglucósidos y a fluoroquinolonas (Kim et al., 2011). Otros, como *oqxAB* descrito en *E. coli*, confieren resistencia a diversos antibióticos así como a biocidas (Hansen et al., 2007; Wong y Chen, 2013). La localización en elementos móviles de genes que disminuyen la sensibilidad a fluoroquinolonas mediante protección de la diana (*qnr*), modificación del antimicrobiano (*aac(6')-Ib-cr*) o mediante bombas de exporte (*qepA*, *oqxAB*) es un

fenómeno creciente en Enterobacterias (Herrera-León et al., 2011; Hopkins et al., 2008; Veldman et al., 2011; Pérez-Moreno et al., 2013) y a menudo ligado a co-resistencia a cefalosporinas y a integrones de la clase I (Strahilevitz et al., 2009).

III.5.- El papel del medio ambiente

El excesivo uso de agentes antimicrobianos para tratar a los seres humanos y a los animales también ha contribuido de forma significativa a la acumulación de estos compuestos en el medio ambiente (Figura 2), por lo que el impacto de dicha acumulación sobre la aparición de la resistencia a los antibióticos no debe ser subestimado (Roca et al., 2015; Wellington et al., 2013). Los agentes antibacterianos tienen varias vías de entrada al medio ambiente, como por ejemplo las aguas residuales o de hospitales, a través de estiércol y el riego (Finley et al., 2013; Heuer et al., 2009). La acumulación de los agentes antibacterianos promueve la selección de microorganismos resistentes, convirtiendo el medio ambiente en un gigantesco reservorio de genes de resistencia a antibióticos que se alimenta de la constante y creciente contaminación. Las plantas de tratamiento de aguas residuales son un punto caliente en la transferencia horizontal de genes y determinantes genéticos que proporcionan resistencia a antibióticos, contaminantes químicos, metales pesados, biocidas, desinfectantes o detergentes.

Las bacterias resistentes a antibióticos existen y perduran de forma estable en el medio ambiente, incluyendo los ecosistemas del intestino de los animales. Incluso los animales de granjas donde se ha reducido el uso de antibióticos continúan albergando genes comunes de resistencia a antibióticos (Aarestrup et al., 2000; Loft et al., 2012; Allen y Stanton, 2014). Se han dado numerosas explicaciones a esta persistencia de la resistencia (Anderson, 2003; Stanton, 2013). Entre ellas destacan la diversidad de subespecies bacterianas existentes, la coselección de clusters de genes de adaptabilidad, y la estimulación de la transferencia horizontal de genes por concentraciones subinhibitorias de antibióticos. La persistencia de genes de resistencia en bacterias comensales crea un reservorio que permite a los patógenos de humanos y animales adquirir genes de resistencia cuando se encuentran bajo presión selectiva (Frye y Jackson, 2013; Wiedenbeck y Cohan, 2011). Además, las bacterias resistentes a los antibióticos presentes en animales de granja son liberadas al medio ambiente (Jindal et

al., 2006). El medio ambiente ofrece una oportunidad para la coexistencia de bacterias procedentes de fuentes dispares, mezclando diferentes fuentes de genes de resistencia (como por ejemplo, la mezcla de cepas ambientales con cepas de origen antropogénico en los lechos de agua) (Pruden, 2013).

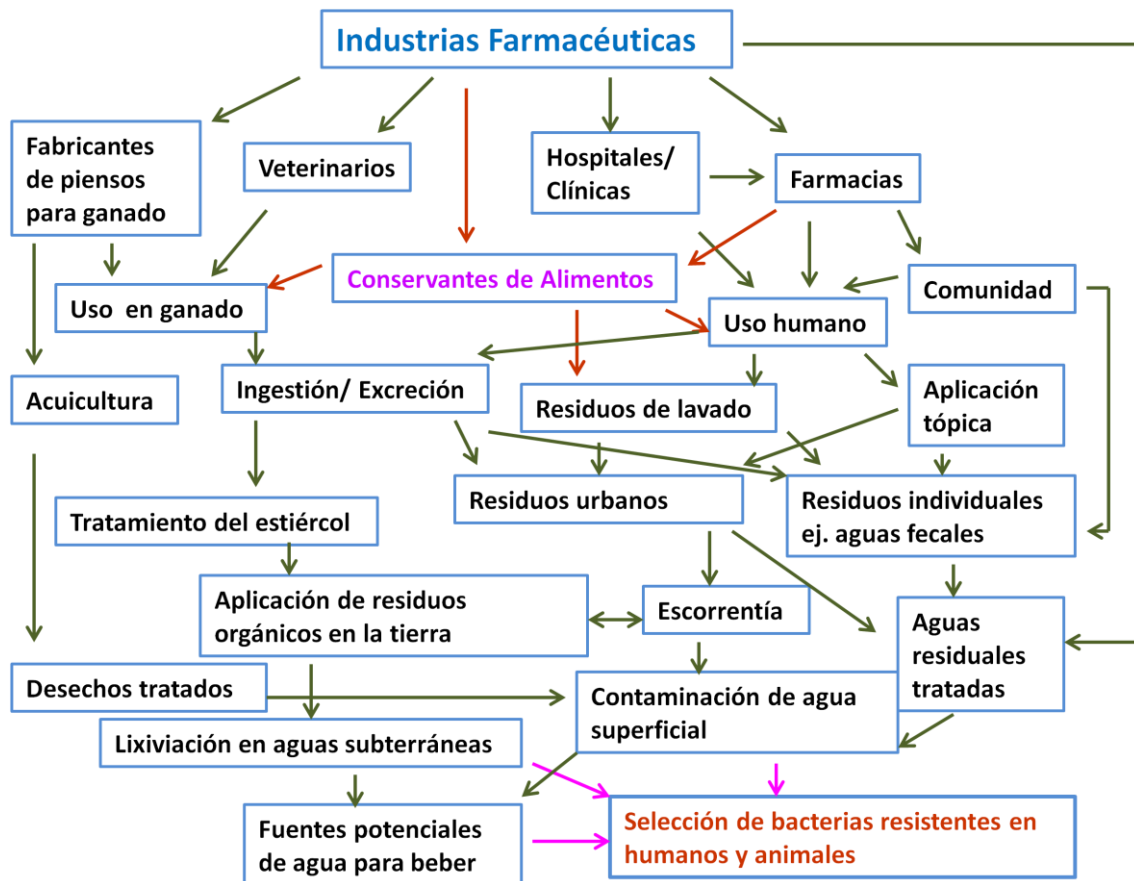


Figura 2. Fuentes y distribución de antibióticos / antibacterianos en el medio ambiente (adaptado de Bbosa et al., 2013 y Kümmerer, 2003).

III.6.- Co-resistencias a biocidas y antibióticos

El aumento del uso de biocidas ha hecho crecer la preocupación también sobre un posible papel en la selección de bacterias resistentes a los antibióticos (SCENIHR, 2009; Ortega Morente et al., 2013; Wales y Davies, 2015). Por tanto, la adquisición de una mayor tolerancia a biocidas de bacterias zoonóticas transmitidas por los alimentos puede tener implicaciones importantes para la salud pública. Un estudio reciente sugiere que las cepas de *Salmonella* sometidas a un tratamiento prolongado con desinfectantes

se vuelven resistentes a los antibióticos usados comúnmente para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella* en los seres humanos tales como cefotaxima y ciprofloxacino (Futoma-Kołoch et al., 2015).

Muchas de las bacterias presentes en la cadena alimentaria pueden llevar diversos genes de resistencia a antibióticos y también a biocidas, aunque no compartan las mismas dianas celulares. Las bacterias pueden inducir mecanismos no específicos de resistencia mediada por bombas de exporte, que puede conllevar a una diversidad de estructuras químicas como sustratos, incluidos los biocidas y antibióticos (Poole, 2005). Por ejemplo, algunos trabajos demostraron que cepas mutantes de *E. coli* resistentes a los aceites de pino y antibióticos expresaban de forma constitutiva la proteína MarA (Moken et al., 1997). La proteína MarA cuando se sobre-expresa regula a AcrAB (aumento de flujo de salida) y cuando no se expresa regula a la proteína de membrana externa OmpF (disminuye la permeabilidad celular) para reducir la susceptibilidad a los antibióticos, aceites de pino, disolventes orgánicos (ciclohexano), sales biliares, antisépticos y desinfectantes, como triclosán, QACs, y clorhexidina (Alekhshun y Levy, 1999; McMurry et al., 1998; Randall y Woodward, 2002). En un estudio de cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. aisladas de aves de corral, la actividad de la bomba de exporte y el bombeo de los componentes activos de tres agentes comerciales domésticos (triclosán, salicilato de sodio, y orto-fenilfenol) sólo se observó en cepas resistentes a antibióticos (Thorrold et al., 2007). Por otra parte, las cepas de *E. coli* de origen porcino resistentes a olaquinox (utilizado como promotor de crecimiento en cerdos) llevaban el gen *oqxA* de la bomba de exporte de multiresistencia, OqxAB (Hansen et al., 2005), que reduce la sensibilidad a antibióticos tales como cloranfenicol, ciprofloxacino, norfloxacina o trimetoprim, también a cloruro de benzalconio y triclosán, y en menor medida a cetrimida y clorhexidina (Hansen et al., 2007). Existe la preocupación de que la tolerancia a biocidas podría coseleccionar resistencias a antibióticos. Es decir, aquellas cepas que son resistentes a antibióticos y de forma simultánea tolerantes a biocidas, podrían tener mayores posibilidades de persistir en la cadena alimentaria (EFSA, 2008).

Se ha descrito resistencia cruzada a los antibióticos y a compuestos de amonio cuaternario (QAC) en una cepa de *Staphylococcus* sp. de origen alimentario (Heir et al., 1995; Sidhu et al., 2002), *P. aeruginosa* (Joynson et al., 2002) y *E. coli* (Langsrud et al.,

2004; Randall et al., 2005). Un estudio con células de *E. coli* adaptadas a QAC demostró que, independientemente de la concentración de QAC utilizada para la adaptación, la exposición a concentraciones gradualmente crecientes de este tipo de desinfectantes presentaban una susceptibilidad reducida a QAC y a antibióticos, así como una resistencia cruzada a los compuestos fenólicos (Soumet et al., 2012). Una cepa mutante de *L. monocytogenes* obtenida tras aumentar progresivamente las concentraciones crecientes de cloruro de benzalconio, presentaba una menor susceptibilidad a la gentamicina y a la kanamicina (To et al., 2002; Romanova et al., 2006). Existe una relación significativa y directa entre la resistencia al triclosan en coliformes fecales y la resistencia al cloranfenicol y nitrofurantoína a niveles clínicamente relevantes (Middleton y Salierno, 2013). Se ha descubierto que algunas cepas de *E. coli* adaptadas al triclosán han aumentado su resistencia al cloranfenicol (Braoudaki y Hilton, 2004), y que cepas de *Salmonella* seleccionadas por su elevada resistencia al triclosan presentan una susceptibilidad reducida frente a varios antibióticos, incluidos el cloranfenicol (Karatzas et al., 2007). Además, las cepas de *Salmonella* expuestas a desinfectantes como cloro o a conservantes como nitrito sódico, benzoato de sodio o ácido acético, o a concentraciones subinhibitorias de otros antimicrobianos (fosfato trisódico, clorito ácido de sodio, ácido cítrico, dióxido de cloro o ácido peroxiacético) también presentan una susceptibilidad reducida a varios antibióticos (Potenski et al., 2003; Alonso-Hernando et al., 2009).

Se han descrito también cepas resistentes a antibióticos de uso clínico que muestran resistencia a biocidas como el triclosan y otros (Chuanchuen et al., 2001; Braoudaki y Hilton, 2004; Ortega Morente et al., 2013). En bacterias Gram-negativas se han descrito numerosos genes para resistencia a biocidas derivados del amonio cuaternario (QAC), como *qacE*, *qacEΔI*, *qacF*, *qacG* y *qacH*. De todos ellos, *qacEΔI* es el que está más extendido, encontrándose en diversos grupos de bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. marcescens*, *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *S. maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus vulgaris*). Se ha descrito que *qacEΔI* (y en menor frecuencia *qacH* y *qacF*) está asociado a integrones de la clase I, junto con genes de resistencia a antibióticos (Mulvey et al., 2006; De Toro et al., 2011). Un estudio sobre poblaciones microbianas de ambientes contaminados con QACs relaciona la mayor

incidencia de resistencia a QACs con una mayor incidencia de integrones de la clase I (Gaze et al., 2005), lo que sugiere que la exposición a QACs podría co-seleccionar resistencia a antibióticos asociados a este tipo de integrones. Otro mecanismo de resistencia se debe a los sistemas de exporte formados por tres componentes (como AcrAB-TolC o OqxAB), que también están ampliamente diseminados en las bacterias Gram-negativas (Poole et al., 2005, 2007; Hansen et al., 2007). Estos sistemas de exporte pueden disminuir la sensibilidad de las bacterias a una amplia variedad de biocidas, como derivados del amonio cuaternario, clorhexidina, triclosan, o cetrimida. Por ejemplo, AcrAB-TolC confiere resistencia al triclosan en *E. coli* y *S. enterica*. La mayoría de los sistemas de exporte son bastante inespecíficos, y confieren resistencias a una variedad de antimicrobianos incluyendo biocidas (como se ha mencionado anteriormente) y antibióticos, como fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas, cetolidos, glicilglicinas, y oxazolidinonas (Poole, 2007).

IV.- BIOPELÍCULAS

Las biopelículas, también conocidas como biocapas o biofilms, están formadas por comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijas a una superficie, que pueden presentar una única especie o un grupo de especies diferentes (Costerton, 1995; Davay y O'Toole, 2000). Las biopelículas se definen como comunidades microbianas embebidas en una matriz polisacárida formadas en interfases líquido-sólido (Steenackers et al., 2011). Podemos encontrar biopelículas en todos los medios donde existan bacterias, como por ejemplo el medio natural y los ambientes clínico e industrial. La formación de biopelículas va a depender de la interacción entre las células bacterianas, la superficie y el medio circundante. La adhesión y las características que conforman la biopelículas de una bacteria dependen de múltiples factores, entre ellos la superficie, la presencia de otras bacterias, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y el pH (Davey y O'Toole, 2000; Donlan y Costerton, 2002; Dunne, 2002; Stoodley et al., 2002). El componente mayoritario de las biopelículas es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. El resto corresponde a las células bacterianas, exopolisacáridos, proteínas, ADN y diversos productos procedentes de la lisis bacteriana.

El proceso de formación de las biopelículas comienza con la adherencia a la superficie. En el caso de las bacterias Gram negativas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* y *Vibrio cholerae* se ha observado que los curli, las fimbrias de tipo I, IV, y los flagelos son importantes para esta etapa. En cambio, en las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie como AtiE, Bap y Esp en esta etapa de adherencia. Para que la bacteria alcance la superficie se ayuda de la motilidad, pudiendo así contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas, aunque dicha motilidad no es un requisito esencial ya que algunas bacterias Gram positivas como estafilococos, estreptococos y micobacterias son inmóviles y son igualmente bacterias formadoras de biopelículas (Lasa et al., 2005). Esta unión depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, y la síntesis de adhesinas y otras proteínas de superficie (Costerton, 1995; O'Toole et al., 2000).

Una vez adherida a la superficie, la bacteria empieza a crecer y a dividirse formando células hijas, las cuales empiezan a esparcirse alrededor del sitio de adherencia formando una microcolonia, proceso que es similar al proceso de formación de colonias en las placas de agar (Lasa et al., 2005). Las células cambian su comportamiento y producen la compleja arquitectura de la biopelícula madura. Uno de estos cambios es la producción de la matriz de exopolisacáridos que actúa como cemento y también forma unas estructuras similares a setas entre las cuales aparecen canales acuosos por donde circulan los nutrientes y los productos de desecho (Danese et al., 2000; Lasa et al., 2005). Aunque la combinación de los factores que influyen en el desarrollo del biofilm depende en principio de la especie, algunas características son comunes para la mayoría de las bacterias estudiadas hasta ahora. La formación de un biofilm no es un proceso aleatorio sino que sigue una sistemática que permite su predicción (Lasa et al., 2005).

Son muchas las evidencias experimentales que sugieren que el proceso de formación de biopelículas obedece a una compleja cascada de regulación génica, y que está regulado por el sistema de *quorum sensing* o autoinducción (Wu et al., 2004). Este sistema es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, llamada autoinductor, que permite a la bacteria detectar la densidad de población existente. En el caso bacterias Gram negativas el

principal autoinductor es una molécula perteneciente al grupo de las acilhomoserina lactonas, mientras que en las bacterias Gram positivas los autoinductores son péptidos.

La formación de biopelículas juega un papel importante en la unión y colonización de superficies bióticas y abióticas (Collignon y Korsten, 2010; Iturriaga et al., 2007; Vestby, et al., 2009; Díez-García et al., 2012), favoreciendo la transmisión y prevalencia de los microorganismos patógenos. Entre los patógenos capaces de formar biopelículas destacan *Legionella pneumophila*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *V. cholerae* y *H. pylori*, aunque estos parecen incapaces de crecer extensamente en la biopelícula debido a los requisitos de crecimiento o a su incapacidad para competir con otros microorganismos de las biopelículas (Rodney, 2002).

En la industria es posible encontrar biopelículas en líneas de procesado de alimentos como productos enlatados, productos avícolas y cárnicos, pastas, galletas, pizzas, pasteles de pescado, queso, productos lecheros, cerveza, especias, vegetales y ensaladas. Además se han hallado en los sistemas de conducción de aire, extractores, transportadores, sistemas de refrigeración, suelos, desagües y en superficies en contacto con los alimentos (Fuster, 2004). La formación de biopelículas en la industria alimentaria conlleva serios problemas higiénicos y pérdidas económicas por los productos que se desechan, por esto es necesaria la eliminación de todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos (Holah y Kearney, 1992; Carpentier y Cerf, 1993).

Los microorganismos formando biopelículas son mucho más resistentes a los antimicrobianos y a la desinfección (Chia, et al., 2009; Jun et al., 2010). En las biopelículas, las bacterias pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos y a otros antimicrobianos comparado con las células en estado planctónico, lo que provoca una gran dificultad para su inactivación. La resistencia de las biopelículas a los agentes antimicrobianos, en gran parte, se puede considerar como un atributo innato resultante del cambio de estilo de vida de la bacteria. Diferentes investigaciones han determinado la influencia de factores intrínsecos a las biopelículas que afectan a la resistencia a los antibióticos (Costerton et al., 1995; Donlan y Costerton 2002; Dunne, 2002; Mah y O'Toole 2001; Patel, 2005; Stewart y Costerton, 2001). En primer lugar, la

matriz de la biopelícula puede actuar como una barrera física y química frente a la difusión, evitando que las moléculas de antibiótico alcancen su diana. En segundo lugar, la creación de microambientes, como zonas con una concentración de oxígeno reducida o con limitación de nutrientes, puede reducir la tasa de crecimiento bacteriana. La consiguiente activación de la respuesta al estrés conlleva cambios fisiológicos en la bacteria que dan como resultado una disminución de su sensibilidad a los agentes antimicrobianos (Lasa et al., 2005). En tercer lugar, es posible que dentro de la biopelícula se diferencie una subpoblación pequeña de bacterias resistentes, reduciendo en gran medida la susceptibilidad a los antibióticos. Los procesos de adaptación para sobrevivir en las biopelículas están regulados a nivel genético.

En un estudio reciente se encontró una mayor resistencia al triclosán en biopelículas de *Salmonella* (Tabak et al., 2007). Así mismo, el estudio realizado por nuestro grupo (Grande et al., 2012) indica una resistencia mucho mayor a diferentes biocidas (cloruro de benzalconio, cetrimida, hexadecilpiridinio, triclosan, hexaclorofeno, clorhexidina, polihexametilen biguanida, y P3 Oxonia). Otro estudio reciente indica que el tratamiento con biocidas induce la expresión de genes de virulencia en *L. monocytogenes* y *Salmonella* (Rodrigues et al., 2011). La formación de biopelículas se ha relacionado también con una mayor capacidad de colonización (p. ej. sobre cálculos biliares) y de liberación prolongada de *Salmonella* en heces (Crawford et al., 2010; Raza et al., 2011). La capacidad para formar biopelículas puede variar considerablemente de una cepa a otra (Díez-García et al., 2012), por lo que se desconoce si las cepas de bacterias entéricas multirresistentes tienen mayor o menor capacidad de formar biopelículas, lo que podría facilitar su persistencia en determinados ambientes.

En los ensayos realizados sobre penetración de los antibióticos en biopelículas de *P. aeruginosa* se demuestra que la matriz de la biopelícula altera la velocidad de penetración de los antibióticos. Las fluoroquinolonas penetran rápidamente y los aminoglucósidos más lentamente, pero aun así todos los antibióticos que fueron ensayados fueron capaces de penetrar hasta el interior de la biopelícula en unas horas y alcanzar concentraciones que resultan bactericidas para las formas planctónicas (Lasa et al., 2005). También se ha visto que el mayor grosor de la biopelícula retrasa la difusión de antimicrobianos comparado con biopelículas más finas (Cochran et al., 2000).

Podemos concluir que la formación de biopelículas es una estrategia para incrementar la tolerancia a los agentes antimicrobianos sin necesidad de expresar genes de resistencia específicos. Por el contrario, las células en estado planctónico dependen más de la expresión de genes de resistencia específicos (como por ej. la producción de β -lactamasas) así como de mecanismos más inespecíficos como aquellos basados en la sobreexpresión de bombas de exporte (Anderl et al., 2000; Bagge et al., 2004a,b; Whiteley et al., 2001).

OBJETIVOS

Las infecciones e intoxicaciones por consumo de alimentos contaminados continúan siendo una constante relevante en el ámbito sanitario de la Unión Europea al igual que en el resto del mundo. También existe una gran preocupación en torno a la resistencia a agentes antimicrobianos empleados con fines terapéuticos. La dificultad para encontrar nuevas moléculas de antibióticos y desarrollar nuevos fármacos que sean útiles en quimioterapia y antibioterapia, junto con la facilidad de adaptación que presentan los microorganismos a los agentes antimicrobianos, podrían convertir de nuevo en incurables enfermedades ya consideradas bajo control, y hacer peligrar nuestro sistema de salud basado en el uso de antimicrobianos. Por otra parte, la industria alimentaria depende del uso de agentes antimicrobianos para mantener la salud animal y el ritmo de producción primaria necesario para abastecer a la población mundial de alimentos. Depende también del uso de otra categoría de sustancias destinadas a reducir los niveles de contaminación en los ambientes de elaboración y procesado de los alimentos, conocidas en su conjunto como desinfectantes o biocidas. La premisa de que los biocidas actúan sobre dianas celulares diferentes a los antibióticos y que por consiguiente el desarrollo de resistencias cruzadas era poco probable, ha dejado de ser cierta. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la presencia de adaptaciones comunes, que permiten mejorar la tolerancia a los biocidas a la vez que aumentan la resistencia a antibióticos. Cuando los determinantes genéticos para tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos se encuentran ligados físicamente, la presión selectiva para cualquiera de ellos da como resultado una co-selección del otro, incrementando la supervivencia de las cepas con dobles o múltiples resistencias aunque sus mecanismos sean diferentes.

La industria alimentaria es un ambiente adecuado para el desarrollo de resistencias a antibióticos y a biocidas. Ello nos llevó a plantear un proyecto de investigación destinado a estudiar la incidencia de resistencias a biocidas y antibióticos en los ambientes de las diferentes industrias alimentarias. En el presente estudio, se recogen los resultados obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo en las industrias láctea y avícola, centrándonos en el huevo como un producto poco estudiado en comparación con los productos de volatería.

Objetivos:

-Determinar la prevalencia de resistencias a biocidas y antibióticos en cepas bacterianas aisladas de la industria láctea productora de materias primas (leche) y transformadora (elaboración de queso a nivel de pequeñas y medianas empresas).

-Determinar la prevalencia de resistencias a biocidas y antibióticos en cepas de los dos patógenos más importantes asociados al huevo: *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.

-Conocer los determinantes genéticos asociados a las resistencias detectadas.

TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

ARTÍCULO 1

María Luisa Fernández Márquez, M^a José Grande Burgos, M^a Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Rosario Lucas. 2017. Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiology*, 62, 77–81.

María Luisa Fernández Márquez, María José Grande Burgos, María del Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, and Rosario Lucas.

Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiology* 2017 Apr;62:77-81.

Abstract

A collection of 120 bacterial isolates from small medium enterprises involved in the production of cow milk and the manufacture of goat cheese were screened for sensitivity to biocides benzalkonium chloride (BC), cetrimide (CT), hexadecylpyridinium chloride (HDP), triclosan (TC), hexachlorophene (CF) and poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride (PHMG). Nineteen isolates were selected according to biocide tolerance and identified by 16S rDNA sequencing as *Lactococcus* sp. (6) *Enterococcus* sp. (1), *Lactobacillus* sp. (4), *Bacillus* sp. (1) *Escherichia* sp. (5), *Enterobacter* sp. (1) and *Helicobacter* sp. (1). These were further characterised regarding antimicrobial resistance phenotype and genotype. Several isolates were multiply (3 or more) tolerant to biocides or resistant to antibiotics, but only two *Escherichia* sp. isolates and *Enterobacter* sp. were multiply resistant to biocides and antibiotics. Statistical analysis of biocide tolerance and antibiotic resistance revealed significant positive correlations between different biocides and between biocides and antibiotics. The biocide tolerance genes most frequently found were *qacEΔ1* and *qacA/B*. The sulfonamide resistance gene *sul1* was found in two *Escherichia* sp. isolates and in *Enterobacter* sp., all of which also carried *qacEΔ1*. Beta-lactam (*bla_{CTX-M}*, *bla_{PSE}*) and tetracycline resistance genes [*tet(A)*, *tet(C)* and *tet(D)*] were detected. Efflux pump genes *acrB* and *mdfA* were found in most Gram-negative isolates. Results from the study suggest that exposure to biocides can indirectly select for antibiotic resistance.

Copyright © Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS:

Antibiotics; Biocides; Enterobacteria; Food; Lactic acid bacteria

PMID: 27889169

DOI: 10.1016/j.fm.2016.10.008

ARTÍCULO 2

María Luisa Fernández Márquez, M^a José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Rosario Lucas. 2017. Biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen eggshells. *Foodborne Pathogens and Disease*, November 2016, ahead of print. doi:10.1089/fpd.2016.2182.

María Luisa Fernández Márquez, María José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, and Rosario Lucas.

Biocide Tolerance and Antibiotic Resistance in *Salmonella* Isolates from Hen Eggshells. *Foodborne Pathogens and Disease* 2016 Nov 14. [Epub ahead of print].

Abstract

The aim of the present study was to determine biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen eggshells. A total of 39 isolates from hen eggshells, identified as either *Salmonella* spp. or *Salmonella enterica* according to 16S rDNA sequencing, were selected for biocide tolerance. Isolates with minimum inhibitory concentrations (MICs) above the wild-type MICs were considered to be biocide tolerant: benzalkonium chloride (BC, 7.7%), cetrимide (CT, 7.7%), hexadecylpyridinium chloride (HDP, 10.3%), triclosan (TC, 17.9%), hexachlorophene (CF, 30.8%), and P3-oxonia (OX, 25.6%). The resulting 21 biocide-tolerant isolates were further characterized. Most isolates (95.2%) were resistant to ampicillin, but only 9.5% were resistant to cefotaxime as well as to ceftazidime. Resistance to chloramphenicol (61.9%), tetracycline (47.6%), streptomycin (19.0%), nalidixic acid (28.6%), ciprofloxacin (9.5%), netilmicin (14.3%), and trimethoprim-sulfamethoxazole (38.1%) was also detected. Considering only antibiotics, 66.7% of isolates were multiresistant; furthermore, 90.5% were multiresistant considering antibiotics and biocides combined. Efflux pump and biocide tolerance genetic determinants detected included *acrB* (95.2%), *oqxA* (14.3%), *mdfA* (9.5%), *qacA/B* (4.8%), and *qacE* (9.5%). Antibiotic resistance genes detected included *bla_{TEM}* (14.3%), *bla_{CTXM-2}* (4.8%), *bla_{PSE}* (4.8%), *floR* (19.05%), *tet(A)* (9.5%), *tet(C)* (4.8%), *dfrA12* (0.05%), and *dfrA15* (0.05%). Significant positive correlations were detected between phenotypic tolerance/resistance to biocides, biocides and antibiotics, and also between antibiotics, suggesting that a generalized use of biocides could co-select antibiotic resistance.

Copyright © Mary Ann Liebert, Inc. publishers.

KEYWORDS:

Salmonella; antimicrobial resistance; biocide tolerance; eggshells

PMID: 27841937

DOI: 2016 Nov 14. [Epub ahead of print]

ARTÍCULO 3

María Luisa Fernández Márquez, M^a José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Rosario Lucas. 2017. Biofilm formation and sensitivity to chemical preservatives and other antimicrobial compounds in *Salmonella* isolates from hen eggshells. *Poultry Science* (submitted).

María Luisa Fernández Márquez, María José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, and Rosario Lucas.

Biofilm formation and sensitivity to chemical preservatives and other antimicrobial compounds in *Salmonella* isolates from hen eggshells. *Poultry Science* 2017 [Submitted].

Abstract

A collection of 21 antibiotic-resistant *Salmonella* isolates from hen eggshells previously selected according to their biocide-tolerance phenotype were used for the present study. Isolates were inspected for biofilm formation capacity and sensitivity to phenolic compounds, chemical preservatives and cationic antimicrobials, and the results studied by principal component analysis. A 14.3% of isolates had a low capacity to form biofilms on polystyrene surfaces, but the rest had medium (33.3%) or high (52.4%) biofilm formation capacity. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were in the range of 3 to 6% (wt/vol) for sodium lactate, 1 to 3% for trisodium phosphate, 0.05% to 0.25% for carvacrol, 0.125% to 0.25% for thymol, or 2.5 to 16 mg/l for polymyxin B. Most isolates were resistant to lysozyme-EDTA combinations. According to these results, trisodium phosphate and phenolic compounds are the best candidates for inactivation of *Salmonella*.

Copyright © 2017 Poultry Science Association Inc.

KEYWORDS:

Salmonella; eggs; preservatives; polymyxin; biofilm

ARTÍCULO 4

M^a José Grande Burgos, María Luisa Fernández Márquez, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Rosario Lucas López. 2016. Virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from hen egg shells. *International Journal of Food Microbiology* 238, 89–95.

María José Grande Burgos, María Luisa Fernández Márquez, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, and Rosario Lucas.

Virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from hen egg shells. *International Journal of Food Microbiology* 2016 Dec 5;238:89-95.

Abstract

Eggs may contain extraintestinal pathogenic (ExPEC) and diarrheogenic (DEC) *Escherichia coli* which in addition may carry antibiotic resistance. The wide use of biocides and disinfectants in the food industry may induce biocide tolerance in bacteria. The aim of the present study was to evaluate biocide tolerance and antibiotic resistance in *E. coli* from hen egg shells. A total of 27 isolates obtained from a screening of 180 eggs were studied. Seven isolates carried both *eae* and *bfpA* genes of typical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains, while 14 isolates only carried *eae* associated with atypical EPEC strains. Shiga toxin genes *stx* and *stx2* were detected in four isolates. Heat-stable and heat-labile enterotoxin genes as well as *aggR* were also detected. Several isolates had minimum inhibitory concentrations (MICs) that were higher than the wild-type for the biocide hexadecylpyridinium chloride (HDP, 18.52%) or the commercial disinfectant P3 oxonia (OX, 14.81%). Antibiotic resistance was detected for ampicillin (37.03%), streptomycin (37.03%), tetracycline (37.03%), chloramphenicol (11.11%), nalidixic acid (18.51%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (14.81%). Eight isolates (29.63%) were biocide tolerant and antibiotic resistant. Efflux pump genes detected included *acrB* (96.29%), *mdfA* (85.18%) and *oqxA* (37.03%), in addition to quaternary ammonium compound (QAC) resistance genes *qacA/B* (11.11%) and *qacE* (7.40%). Antibiotic resistance genes detected included *bla_{CTX-M-2}* (22.22%), *bla_{TEM}* (3.70%), *bla_{PSE}* (3.70%), *tet(A)* (29.63%), *tet(B)* (29.63%), *tet(C)* (7.40%), *tet(E)* (11.11%), *aac(6)-Ib* (3.70%), *sul1* (14.81%), *dfrA12* (3.70%) and *dfrA15* (3.70%). Most isolates (96.30%) carried more than one genetic determinant of resistance. The most frequent combinations were efflux pump components *acrB* and *mdfA* with tetracycline resistance genes (33.33% of isolates). Isolates carrying QAC resistance genes also carried between 4 and 8 of the additional antimicrobial resistance genes investigated. Regardless of biocide tolerance and antibiotic resistance, all isolates were sensitive to carvacrol (0.25%), thymol (0.125%) and trisodium phosphate (1 to 1.5%), but they exhibited a heterogeneous response to sodium lactate and lysozyme-EDTA combinations that apparently were not related with antibiotic resistance. Results from the study reveal not only a low incidence of biocide tolerance but also the presence of multiple resistance strains carrying multiple genetic determinants of resistance.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

KEYWORDS:

Antimicrobial resistance; Biocides; Eggs; *Escherichia coli*

PMID: 27607065

DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.037

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de esta tesis han revelado la presencia de bacterias tolerantes a biocidas a partir de los ambientes de pequeñas y medianas empresas que se dedican a la producción de leche de vaca o de queso de cabra. Las cepas aisladas se dividieron en dos grupos (Gram-positivas y Gram-negativas) antes de ser sometidas a tratamientos con biocidas, puesto que en un estudio previo se demostraba que las bacterias Gram-positivas podían tener concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más bajas que las Gram-negativas para ciertos biocidas tales como cloruro de benzalconio, mientras que ocurre todo lo contrario o bien no se observan tales diferencias en el caso de otros biocidas, como el triclosan (Morrissey et al., 2014).

Gran parte de los aislados seleccionados tolerantes a biocidas pertenecían a bacterias del ácido láctico (BAL), como se esperaba dado el entorno del muestreo. En concordancia con estos resultados, un estudio previo en el que se aislaron bacterias resistentes a biocidas y antibióticos, procedentes de una planta de producción de carne, concluyó que las BAL, compuestas principalmente por *Lactobacillus* spp., eran el segundo grupo en el que se observaba tolerancia a las concentraciones más bajas de biocidas después de *Pseudomonas* y psicrotrofos (Lavilla et al., 2013). Los biocidas a los que se observa tolerancia en la mayoría de los casos son clorhexidina y triclosan, seguidos de compuestos derivados de amonio cuaternario e hidrocloreto de polihexametileno biguanida (PHMG) (Lavilla et al., 2013). En otro estudio, en el que se ensayó la resistencia a cloruro de benzalconio en 320 cepas de BAL de la industria alimentaria y cárnica, se describieron cinco de las cepas (el 1,5%) como resistentes y 56 cepas (el 17,5%) como tolerantes (Sidhu et al., 2002). Otro estudio posterior (Arioli et al., 2013) determinó que en las BAL no es frecuente encontrar una baja sensibilidad a cetrimida, cloruro de benzalconio, clorhexidina, e hipoclorito de sodio. La mayoría de las cepas de BAL seleccionadas en el presente estudio fueron tolerantes a un solo biocida, y sólo unas pocas parecían ser multi-tolerantes. Estos resultados están de acuerdo con los resultados de Arioli et al., (2013), que no encontraron una relación sistemática a la co-tolerancia entre dos o más biocidas ensayados.

Sin embargo, las únicas especies en común entre este estudio y el presente trabajo fueron *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactococcus garvieae*, y los biocidas cloruro de benzalconio y triclosan. En la literatura científica no hemos encontrado datos sobre la

tolerancia a biocidas para otras especies como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus buchneri* o *Lactococcus lactis*. Según Arioli et al., (2013), las CMI para cloruro de benzalconio y triclosan en *L. garvieae* estaban comprendidas entre 2 y 4 mg/l. Sin embargo, mientras que las CMI para el cloruro de benzalconio en *L. rhamnosus* estaban en el rango de 1 a 4 mg/l, para esta misma bacteria la sensibilidad a triclosan era más heterogénea, ya que algunas cepas de esta especie tenían una CMI para triclosan de 64 mg/l. En nuestro estudio, se encontró una cepa *L. garvieae* que presentaba una CMI de 10 mg/l para el cloruro de benzalconio y de 25 mg/l para el triclosan. Esta cepa lleva el gen *qacEΔ1* (que además se encuentra también en otras cuatro de las BAL aisladas). Este gen determinante de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (QAC) puede estar presente tanto en bacterias Gram-positivas como en las Gram-negativas. Un estudio previo demostró que el gen *qacEΔ1* presente en cepas de *Enterococcus* tenía una secuencia de nucleótidos idéntica a la del gen situado en el integron Inc en *Pseudomonas aeruginosa* (Kazama et al., 1998). Los resultados de este estudio también indican que *qacEΔ1* puede ser un gen de tolerancia generalizada a biocidas. En cuanto al biocida PHMG, la mayoría de las cepas Gram-positivas aisladas se inhibieron con 25 mg/l, a excepción de cinco de las BAL (tres de los cuales pertenecían al género *Lactobacillus*). Un estudio previo indicó que *Lactobacillus acidophilus* era altamente tolerante al PHMG, ya que la exposición a una concentración de 1% de PHMG durante 5 minutos tuvo poco efecto en la viabilidad de esta bacteria, mientras que el mismo tratamiento tuvo un fuerte efecto bactericida frente a *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *Escherichia coli* (Vitt et al., 2015).

Algunas BAL aisladas en el presente estudio mostraban co-resistencia a biocidas y antibióticos. En particular, una de las cepas de *L. lactis* y una cepa de *L. garvieae* fueron tolerantes a tres biocidas (cloruro de benzalconio, cetrimida y triclosan) y resistentes a dos antibióticos. El análisis estadístico reveló una alta correlación positiva significativa entre cloruro de benzalconio y triclosan, y también se encontró relación entre la tolerancia a estos biocidas y la resistencia a la ampicilina. Además, las cepas tolerantes a PHMG como *L. garvieae*, *Lactobacillus sakei* y *L. rhamnosus* fueron resistentes a 4 de los 5 antibióticos ensayados, aunque las correlaciones positivas observadas no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados confirman la preocupación de que los biocidas puedan seleccionar indirectamente a BAL resistentes los antibióticos y que éstas se multipliquen en la cadena alimentaria. Esto podría

augmentar los riesgos de prevalencia y la transmisión de resistencia a los antibióticos. Por otra parte, mientras que la mayoría de lactococos se encuentran de forma natural en la hierba, en la boca y en las ubres de las vacas (Teuber, 1995) y en los productos lácteos fermentados, *L. garvieae* es un patógeno reconocido para animales (Teuber, 1995) que causa mastitis en vacas y enfermedades en peces (Devriese et al., 1999; Eynogor et al., 2004; Pitkälä et al., 2004; Vendrell et al., 2006), una circunstancia que potencia la exposición de esta bacteria a los antibióticos utilizados con fines terapéuticos. Estudios previos han demostrado resistencia a los antibióticos en lactococos presentes en alimentos (Flórez et al., 2005, 2015; Ammor et al., 2007; Devirgiliis et al., 2013; Temmerman et al., 2003) así como en lactobacilos, tales como *L. casei* y *L. rhamnosus* presentes en carnes y productos lácteos (Gevers et al., 2003; Coppola et al., 2005; Ammor et al., 2008; van Hoek et al., 2008; Zonenschain et al., 2009), aunque no se investigó la tolerancia a biocidas de las cepas resistentes a antibióticos.

Otra cuestión a destacar del presente estudio es que se observó que en las BAL había diferencias notables en la sensibilidad a las diferentes combinaciones de lisozima-EDTA ensayadas y también en la tolerancia al fosfato trisódico. En particular, los tres aislados resistentes a todas las combinaciones de lisozima-EDTA estudiadas también fueron resistentes al 3% de fosfato trisódico. Dado que el EDTA y el fosfato trisódico actúan como quelantes, estos resultados sugieren una mayor resistencia a los agentes quelantes en las cepas mencionadas anteriormente. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas en la tolerancia a compuestos fenólicos como carvacrol y timol en ninguna de las cepas.

Una de las cepas tolerantes al cloruro de benzalconio del presente estudio fue identificada como *Bacillus cereus*. En comparación con otras bacterias, hasta el momento, sólo han sido descritas un pequeño número de cepas de *B. cereus* tolerantes a biocidas (Fernández-Fuentes et al., 2012, 2014). En un estudio previo se demostró que la tolerancia de *B. cereus* al cloruro de benzalconio era consecuencia de una regulación positiva de genes que codifican para enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, particularmente la acetil coenzima A (acetil-CoA, acetiltransferasa y enoil-CoA hidratasa) con el fin de contrarrestar el daño causado en la membrana citoplásmica por este biocida (Ceragioli et al., 2010). Dado que la cepa tolerante al cloruro de

benzalconio del presente estudio no mostró ninguno de los genes de resistencia investigados para este biocida, el mecanismo propuesto por Ceragioli et al., (2010) podría ser posiblemente el responsable de la tolerancia observada frente al cloruro del benzalconio. Curiosamente, esta cepa seleccionada es resistente a las cefalosporinas de tercera generación. El uso de cefalosporinas de tercera generación para el tratamiento de enfermedades en animales de granja, promueve la selección de cepas productoras de beta-lactamasa. En particular, *B. cereus* puede expresar múltiples beta-lactamasas, incluidas las metalo-beta-lactamasas con cierta actividad cefalosporinasa (Hussain et al., 1985; Cid et al., 1988). Algunas de estas cepas están descritas como los microorganismos con una mayor capacidad degradativa (por sus actividades proteolítica y lipolítica) entre las bacterias presentes en la leche (Wagner et al., 2011; Erickson et al., 2014). La cepa caracterizada en el presente estudio fue aislada de un tanque de almacenamiento de leche y probablemente está relacionada con la contaminación ambiental. *B. cereus* es considerada una bacteria causante de intoxicaciones alimentarias, que también puede causar infecciones oportunistas en humanos (Bottone, 2010). Es difícil erradicarla de las instalaciones de procesamiento de alimentos, debido a su capacidad para formar biopelículas y producir endosporas, con gran tolerancia a los desinfectantes y al calor.

Las CMI's obtenidas frente a cloruro de benzalconio en los aislados de *E. coli* eran acordes con otros estudios previos (Hammond et al., 1987; Aarestrup y Hasman, 2004; Morrissey et al., 2014), y sólo se detectaron algunas cepas tolerantes a concentraciones del biocida por encima de 75 mg/l. La mayoría de las cepas de *E. coli* tolerantes a cloruro de benzalconio aisladas en nuestro estudio también lo eran para PHMG, además de hexaclorofeno o cetrimida en algunos casos. Un estudio en 2015 demostró que una cepa de *E. coli* procedente de carne, toleraba una amplia gama de desinfectantes como bromuro de cetiltrimetilamonio, N,N-didecil-cloruro, N,N-dimetilamonio, N-bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio, algunos de ellos hasta 512 o 1024 mg/l (Zhang et al., 2015). En un estudio anterior sobre cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas a partir de vacuno (canales, heces, piel y carne picada) en Estados Unidos, se observó que el 20% de las 344 cepas estudiadas eran resistentes a la clorhexidina o al cloruro de benzalconio (Beier et al., 2013). Los autores encontraron una mayor resistencia a los antibióticos como sulfisoxazole (10,5%), tetraciclina (9,9%), estreptomicina (7%), y cloranfenicol (4,9%), pero no demostraron correlación entre la

resistencia al desinfectante y la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, sólo se encontraron correlaciones positivas significativas para PHMG con AMP y TM-STX y para cloruro de hexadecilpiridinio con estreptomicina en las cepas Gram-negativas.

La tolerancia a biocidas está mediada en la mayoría de los casos a través de bombas de exporte, muchas de las cuales tienen una amplia especificidad de sustrato (Poole, 2007). En el presente estudio, todas las cepas de *E. coli* y de *Enterobacter cloacae* tolerantes a biocidas llevan los genes para las bombas de exporte *acrB* y *mdfA*. El sistema AcrAB-TolC y otros sistemas de exporte relacionados pertenecientes también a la familia restricción-nodulación-división (RND) ampliamente diseminada en bacterias Gram-negativas, pueden reducir la sensibilidad a una amplia variedad de biocidas, tales como los QAC, clorhexidina, triclosan, ceftriaxona o Ag⁺, además de algunos antimicrobianos destinados para uso terapéutico (Poole, 2005, 2007). En *E. coli*, la bomba de exporte AcrAB-TolC le confiere resistencia a múltiples antibióticos, colorantes, sales biliares y detergentes (Poole, 2004; Seeger et al., 2008). Además, el gen *mdfA* de *E. coli* codifica para la bomba de exporte MdfA, que pertenece a la denominada superfamilia principal de transportadores facilitadores (Edgar y Bibi, 1997; Lewinson y Bibi, 2001). Las células que expresan MdfA a partir de un plásmido multicopia son sustancialmente más resistentes a un grupo muy diverso de compuestos lipofílicos catiónicos o dipolares, tales como el bromuro de etidio, tetrafenilfosfonio, rodamina, daunomicina, cloruro de benzalconio, rifampicina, tetraciclina y puromicina. También confiere resistencia a los antibióticos químicamente no relacionados entre sí, pero clínicamente importantes, tales como el cloranfenicol, eritromicina y ciertos aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Edgar y Bibi, 1997).

Un estudio previo sobre cepas de *E. coli* aisladas a partir de carnes vendidas al por menor en EE.UU. indicaba que los genes de resistencia de las bombas de exporte *emrE*, *sugE(c)*, *mdfA* e *ydgE/ydgF* estaban comúnmente presentes (entre 77,2% -100%) en las cepas (Zou et al., 2014). Aunque los genes *qac* y *sugE* eran menos frecuentes, los autores indicaron que *sugE(p)* y *qacEΔ1* estaban altamente asociados con fenotipos de resistencia a múltiples fármacos y que también presentaban CMI's elevadas para desinfectantes. En el presente estudio, el gen *qacEΔ1* ha sido el gen de resistencia a biocidas encontrado con mayor frecuencia entre las cepas Gram-negativas investigadas, y también se asocia con otros genes de bombas de exporte (*acrB* y *mdfA*) presentes en

seis de los aislados. Varias cepas Gram-negativas aisladas, también llevaban el gen *sull* además de *qacEΔI*. Esta combinación se asocia típicamente con el segmento 3' conservado del integrón de Clase I (White et al., 2001). Además, una de estas cepas también dio positivo para el gen *intl* presente en dicho integrón. En la cepa aislada de *Helicobacter* sp., *qacEΔI* parecía estar situado muy cerca de *sull*, atendiendo al resultado positivo obtenido por PCR utilizando un cebador directo y un cebador *qacEΔI* *sull* inverso. La mayoría de los genes encontrados en integrones de clase I confieren resistencia a varias clases de antibióticos.

Sorprendentemente, la cepa multi-resistente de *E. cloacae* aislada en el presente estudio llevaba varios genes de resistencia y su perfil de resistencia a los antibióticos (ampicilina, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina) se asemeja fenotípicamente al ASSuT distribuido ampliamente en *Salmonella enterica* (Briggs y Fratamico, 1999). Un estudio anterior (Kücken et al., 2000) demostró que una cepa de *E. cloacae* portadora del gen *qacEΔI* era multiresistente a antibióticos (ampicilina, amoxicilina, ácido clavulánico, mezlocilina, piperacilina, cefotaxima, ciprofloxacina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol). Además, *qacEΔI* y *sull* se han descrito anteriormente en *Enterobacter aerogenes*, asociados a un integrón de clase I (Ploy et al., 1998). Aunque los genes de resistencia a antibióticos no han sido investigados extensamente, el único gen de resistencia a antibióticos detectado también en *E. coli* tolerante a biocidas es *tet(A)*. Curiosamente, *tet(A)* se ha descrito en integrones de clase I en *S. enterica*, asociado con *sull* (Beutlich et al., 2011), pareciéndose nuestros resultados con los *tet(A)*-positivos de *E. coli* y *E. cloacae*. Además, la cepa de *Helicobacter* spp. tolerante a biocidas también dio positivo para el gen ESBL *bla_{TEM}*. Los genes codificadores de beta-lactamasa (principalmente *bla_{PSE1}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CMY}*, y *bla_{DHA}*) pueden estar asociados con integrones de clase I (Brigs y Fratamico, 1999; Smet et al., 2010; Beutlich et al., 2011; De Toro et al., 2011). También han sido encontrados de forma puntual, otros genes de beta-lactamasas asociados con el integrones de clase I en enterobacterias y en *Pseudomonas* (Giakkoupi et al., 2000; Poirel et al., 1999, 2000, 2001; Vourli et al., 2003). Por tanto, el fondo genético de las cepas Gram-negativas resistentes a antibióticos y tolerantes a biocidas aisladas en este trabajo merece ser investigado en profundidad en un estudio adicional.

La superficie del huevo está expuesta a la contaminación con microorganismos procedentes de diferentes fuentes tales como heces, agua, material de la jaula, material de nidificación, insectos, manos, roturas en el huevo, sangre, tierra o polvo en la cinta transporte de huevos (Board y Tranter, 1995; Ricke et al., 2001). Para evitar la transmisión de patógenos transmitidos por los alimentos a través de los huevos y cáscaras de huevo se han empleado desinfectantes (Ayres et al., 1967; Hutchison et al., 2004). El tratamiento de los huevos con cloro o aerosoles de QAC como último paso de desinfección seguido de un lavado ha sido estandarizado durante décadas para el procesado de huevos en EE.UU (<http://www.farms.com/news/development-of-best-practices-for-shell-egg-disinfection-based-upon-efficacy-egg-quality-and-economics-71870.aspx>). Sin embargo, otras investigaciones sugieren que los procesos de limpieza y desinfección de las cáscaras de huevo actualmente empleadas en la industria comercial de huevos pueden no eliminar por completo las bacterias de la superficie de las cáscaras de huevo (Al-Ajeeli et al., 2016). El uso de desinfectantes en los huevos para incubar es también una práctica común para reducir la presencia de patógenos en la superficie que puedan transferirse a los polluelos recién nacidos, siendo el peróxido de hidrógeno el agente más utilizado (Cox et al., 2007).

En cuanto al estudio de las cepas de *Salmonella* aisladas de la superficie de huevos, un alto porcentaje de las cepas (el 53,8%) necesitaron para inhibir su crecimiento, concentraciones de biocidas superiores a las de fenotipos salvajes al menos para uno de los biocidas ensayados. Una excepción fue el PHMG, biocida para el que no se han detectado cepas tolerantes. En un estudio anterior sobre cepas de *Salmonella* procedentes de carne, el cloruro de benzalconio inhibía la mayoría de las cepas aisladas (86,1%) a 50 mg/l y sólo una cepa necesitó una concentración mucho mayor de 250 mg/l para su inhibición (Marín Garrido et al., 2015). También se detectaron en este estudio cepas aisladas tolerantes a cetrimida, hexadecilpiridinio y triclosan. En el presente estudio, el porcentaje de cepas aisladas tolerantes a compuestos derivados del amonio cuaternario como cloruro de benzalconio, cetrimida y cloruro de hexadecilpiridinio fue bajo, mientras que la incidencia de la tolerancia a bisfenoles (especialmente hexaclorofeno) y agentes oxidantes (P3 Oxonia) fue alta.

Los compuestos del amonio cuaternario son ampliamente utilizados para desinfectar las superficies de utensilios e instrumentos en alimentación (Ueda y

Kuwabara, 2007; SCENIHR, 2009). El cloruro de hexadecilpiridinio (cloruro de cetilpiridinio) fue aprobado en 2004 por la FDA de Estados Unidos para la descontaminación de carne de ave a una concentración no superior al 0,8% (Food and Drug Administration, 2004). Entre las posibles utilidades de los bisfenoles, el triclosan se incorpora en una amplia gama de productos tales como paños de cocina, cajas de comida, cepillos de dientes, jabón de manos, geles de baño, plásticos, tablas de cortar, palillos, cortadores de pizza, contenedores de almacenamiento de alimentos, bolsas de basura, etc..., entre otros, y el hexaclorofeno se utiliza a menudo en los jabones y también como agente antibacteriano y desinfectante de uso tópico (Yazdankhah et al., 2006; SCENIHR, 2009). La poliguanida PHMG es un desinfectante comercial muy eficaz frente a bacterias Gram-negativas, incluida *Salmonella*. El P3 Oxonia es un producto desinfectante muy utilizado en la industria alimentaria para la rápida desinfección de superficies de acero inoxidable, tubos, tanques de almacenamiento o maquinaria de llenado entre otros. Los biocidas y desinfectantes se pueden utilizar para el lavado de huevos, una operación muy común en muchos países, como Estados Unidos, Australia y Japón (Hutchison et al., 2004) o en la Unión Europea en el caso de huevos destinados a la transformación en otros productos (huevos de clase B) (Hutchison et al., 2004). Al-Ajeeli et al., (2016) describieron que los tratamientos basados en la pulverización con soluciones de cloro (100 ppm de cloro disponible) y aerosoles de QACs (200 ppm) eran eficaces en la reducción de la carga de aerobios mesófilos presentes en la cáscara de huevo así como para la inactivación de *Salmonella* Enteritidis. Sin embargo, también se ha visto que las bacterias son capaces de protegerse de los desinfectantes en los poros de la cáscara de huevo (Mezhoud et al., 2016).

Presumiblemente, las cepas de *Salmonella* con mayor tolerancia a los desinfectantes tales como P3 Oxonia u otros biocidas, tienen mayores posibilidades de supervivencia en los procesos de desinfección, especialmente cuando las soluciones de biocidas están por debajo de las concentraciones de uso recomendadas (por ejemplo, por dilución al mezclarse con líquido residual presente en los tanques, las líneas de procesado o el suelo) o si las cepas tolerantes a biocidas están unidas a superficies formando biopelículas. El hecho de que algunas cepas aisladas en este trabajo sean tolerantes a más de un biocida incluyendo biocidas de diferentes clases químicas, (especialmente en el caso de los aislados UJAS2, UJAS6, UJAS10, UJAS18 y UJAS19) aumentaría probablemente sus posibilidades de supervivencia en las instalaciones de

procesado de alimentos. Por otra parte, las correlaciones positivas encontradas entre la tolerancia a diferentes biocidas (por ejemplo cloruro de benzalconio, cetrimida o triclosan y cloruro de hexadecilpiridium) podría tomarse como un argumento a favor de la co-selección de la tolerancia biocida.

Otra preocupación es la incidencia de la resistencia a los antibióticos en cepas tolerantes a biocidas (Buffet-Bataillon et al., 2012; Ortega Morente et al., 2013). En otros estudios previos se determinó que la resistencia a la ampicilina es común en cepas de *Salmonella* tolerantes a biocidas, así como la resistencia a cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico o sulfonamidas, como consecuencia del uso terapéutico prolongado de estos antimicrobianos (EFSA, 2010; EFSA-ECDC, 2013). El uso de florfenicol en animales de granja puede haber generado una resistencia cruzada a cloranfenicol mediada por el gen *floR* (White et al., 2000). En el presente estudio, dos de las cepas aisladas (UJAS18 y UJAS19) fueron resistentes a ceftazidima, cefotaxima y ciprofloxacino, los dos últimos se utilizan comúnmente para el tratamiento de las infecciones invasivas producidas por *Salmonella* en seres humanos. Estas dos cepas fueron resistentes a los 9 antimicrobianos diferentes ensayados. En estudios anteriores también se ha demostrado una alta prevalencia de cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos, todas ellas aisladas de productos avícolas (Álvarez-Fernández et al., 2012; Adesiyun et al., 2007; Antunes et al., 2003; Arvanitidou et al., 1998; Duffy et al., 1999; Soufi et al., 2012). Por otro lado, Pande et al., en 2015 detectaron una incidencia muy baja de resistencias a amoxicilina y ampicilina (5.51%), tetraciclina (4.13%), cefalotina (2.06%), o trimetoprim (0.68%) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas en Australia de gallinas ponedoras de huevos y de las cáscaras de huevos de granjas de gallinas ponedoras en jaulas.

Cabe resaltar que las cepas multirresistentes UJAS18 y UJAS19 aisladas en el presente estudio también eran tolerantes a 4 o 5 biocidas, y que el análisis estadístico de los datos reveló una correlación positiva altamente significativa para las resistencias entre ciprofloxacino, cefotaxima y ceftazidima, así como para estos tres antibióticos con el ácido nalidíxico. Por otra parte, la resistencia a estos antibióticos mostró correlaciones positivas moderadas o fuertes con la tolerancia a biocidas como cloruro de benzalconio, cetrimida, cloruro de hexadecilpiridinio o triclosan, lo que sugiere que la exposición a los biocidas podría co-seleccionar la resistencia a antibióticos y facilitar la

persistencia de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos en la superficie de los alimentos.

Algunos estudios vinculan la tolerancia a biocidas y la resistencia a los antibióticos en cepas de *Salmonella*. Un estudio anterior de nuestro grupo sobre resistencia a biocidas en bacterias Gram-negativas aisladas de alimentos ecológicos (distintos de los huevos) mostró que muchos aislados bacterianos fueron simultáneamente tolerantes a biocidas y resistentes a los antibióticos (Fernández Fuentes et al., 2014). En particular, una cepa de *Salmonella* tolerante al hexaclorofeno y la clorhexidina era también resistente a la amoxicilina, cefuroxima y eritromicina. La resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas y entre diferentes biocidas ha sido descrita también en otras bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa* (Lambert et al., 2001; Murtough et al., 2001; Lavilla Lerma et al., 2015). Estudios anteriores demostraron que las cepas adaptadas a la exposición a concentraciones subinhibitorias de biocidas en condiciones de laboratorio, modifican sus perfiles de resistencia a antibióticos. Por ejemplo, las variantes estables de *Salmonella* aisladas después de un tratamiento con un desinfectante de amonio cuaternario, que contiene formaldehído y glutaraldehído, una mezcla de compuesto oxidante y un desinfectante alquil fenólico, mostraron una susceptibilidad reducida a ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina y ampicilina, y redujeron los niveles de proteínas de membrana externa (Karatzas et al., 2007, 2008).

Otro estudio mostró que la exposición a una combinación de biocidas que contenían dodecilamina daba lugar a resistencia a cotrimoxazol, cefotaxima y ciprofloxacino (Futoma-Kołoch et al., 2015). Por el contrario, otro estudio (Condell et al., 2012) no reveló ninguna correlación entre la reducción de la susceptibilidad a las combinaciones de biocidas empleadas en la industria alimentaria y la resistencia a compuestos antimicrobianos clínicamente relevantes. Sin embargo, las cepas adaptadas por la exposición a biocidas específicos, tales como cloruro de benzalconio o triclosan presentaban una alteración en el perfil de susceptibilidad a diferentes clases de antibióticos. En los mismos términos, Braoudaki y Hilton, (2004) encontraron que *S. enterica* serotipo Virchow adaptada al cloruro de benzalconio presentaba una elevada resistencia a la clorhexidina. Para *Salmonella* Enteritidis, la resistencia cruzada se produjo sólo entre eritromicina y clorhexidina. *Salmonella* Typhimurium mostró

resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas, entre la eritromicina y clorhexidina, así como entre la clorhexidina y otros biocidas. Cuando se estudió *Salmonella* Virchow, se encontró un alto grado de resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas (por ejemplo, entre eritromicina y triclosan y entre eritromicina y clorhexidina), y también entre biocidas (por ejemplo, entre cloruro de benzalconio y triclosan y entre clorhexidina y triclosan).

También se ha descrito resistencia cruzada para la eritromicina con cloranfenicol y con trimetoprim, para el cloruro de benzalconio con amoxicilina, amoxicilina ácido clavulánico, cloranfenicol, imipenem y trimetoprim, y para la clorhexidina con tetraciclina. Las cepas de *E. coli* O157 adaptadas a triclosan mostraron una disminución de la susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos, incluyendo cloranfenicol, eritromicina, imipenem, tetraciclina, trimetoprim, así como a una serie de biocidas. En consonancia con resultados anteriores, un estudio reciente de nuestro grupo indicó que las cepas de *Salmonella* de alimentos ecológicos adaptadas por la exposición repetida a cetrimida y hexaclorofeno mostraban una mayor tolerancia a los biocidas y antibióticos (Gadea et al., 2016). Además, otro estudio indicó un aumento de la resistencia a compuestos fenólicos en *E. coli* después de la adaptación a compuestos del amonio cuaternario (Soumet et al., 2012).

Se ha sugerido que la resistencia a antibióticos en cepas adaptadas a biocidas puede deberse a la activación de la expresión de las bombas de exporte y/o a alteraciones en la permeabilidad celular (Condell et al., 2012). La mayoría de los antibióticos utilizados en el presente estudio (por ejemplo, ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido nalidíxico y tetraciclina) pueden ser utilizados como sustrato por las bombas de exporte de resistencia nodulación-división (Poole, 2004). En particular, se detectó el gen *acrB* del sistema de bomba de exporte AcrAB-TolC en todas las cepas aisladas del presente estudio. Sin embargo, entre los genes para bombas de exporte restantes investigados, sólo se detectaron *mdfA* que pertenece a la superfamilia principal de transportadores facilitadores y el gen *oqxA*, que codifica para una bomba que exporta olaquinox. Además, sólo se detectaron los genes de tolerancia a biocida *qacA/B* y *qacE*, en algunas cepas. Estos resultados sugieren que la tolerancia observada a los biocidas puede no deberse a la adquisición de genes específicos de tolerancia a biocidas sino más bien a adaptaciones no específicas que posiblemente incluyen cambios en la

susceptibilidad de la membrana hacia los biocidas y/o en la activación de bombas de exporte no específicas. Por ejemplo, la proteína MarA del operón *mar* activa la expresión de *acrAB* (incrementando el exporte) y reprime la expresión de la proteína de membrana externa OmpF (disminuyendo la permeabilidad celular) para reducir la susceptibilidad a los antibióticos, disolventes orgánicos y biocidas, (Randall y Woodward, 2002; Ortega Morente et al., 2013).

Los genes de resistencia a antibióticos de especial relevancia detectados en el presente estudio incluyen *bla*_{TEM}, *bla*_{CTXM-2} y *bla*_{PSE}. La resistencia a los antimicrobianos en las cepas de *Salmonella* se ha relacionado con integrones (Boyd et al., 2000; Doublet et al., 2005). Estos operones contienen genes que confieren resistencia a los agentes antimicrobianos, incluyendo aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol y trimetoprim, así como genes que confieren resistencia a antisépticos y desinfectantes (Rowe-Magnus y Mazel, 2002). En particular, el integrón de clase 1 (Boyd et al., 2000; Levings et al., 2005) puede conferir resistencia a la ampicilina (*bla*_{PSE1}), cloranfenicol/florfenicol (*florR*), estreptomicina/espectinomicina (*aadA2*), sulfametoxazol (*sulI*), y tetraciclina [*tet(G)*] (Boyd et al., 2001). El integrón también puede contener una gran variedad de otros genes de resistencia (Beutlich et al., 2011), incluyendo genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario *qacEΔ1* y *qacH* (Mulvey et al., 2006; de Toro et al., 2011). Los genes de resistencia a antimicrobianos que pueden estar asociados al integrón de clase 1 de *Salmonella* detectados en las cepas aisladas en este trabajo son: *floR*, *dfrA12*, *dfrA15*, *bla*_{PSE}, *bla*_{TEM} y *qacE*. En particular, las cepas UJAS38 y UJAS39 presentan *sulI* y UJAS38 también dio positivo para el gen de la integrasa *intl*. Ambas cepas presentan *tet(A)* y *bla*_{TEM}, una combinación también encontrada en la variante de la isla genómica SGI1-K1 de *Salmonella*, que acumula diferentes genes de resistencia (Beutlich et al., 2011). Estos aislados merecen ser investigados más a fondo con el fin de determinar la posible asociación entre el integrón y los determinantes genéticos de resistencia detectados.

La formación de biofilms es un importante mecanismo mediante el cual las bacterias pueden sobrevivir a procesos de desinfección y a los tratamientos con antibióticos (Corcoran et al., 2014). Los resultados del presente estudio indicaron que la mayoría de los aislados de *Salmonella* tenían una capacidad media o alta para formar biofilms en placas de microtitulación de poliestireno. Esto incluye los aislados

multirresistentes UJAS38 (resistente a 9 antibióticos y 5 biocidas) y UJAS39 (resistente a 9 antibióticos y 4 biocidas). Estudios anteriores han demostrado que *Salmonella* puede formar biofilms en superficies de contacto con alimentos tanto en ambientes industriales como domésticos (Manijeh et al., 2008; Moretro et al., 2012; Rodrigues et al., 2011).

Joseph y Karunasagar, (2001) mostraron que las células de los biofilms de *Salmonella* formados sobre plástico, cemento y acero tenían una mayor tolerancia a desinfectantes como el hipoclorito e iodóforos. Los biofilms de *Salmonella* formados sobre superficies de poliestireno confieren una mayor tolerancia a todos los biocidas ensayados en comparación con las células planctónicas: P3 Oxonia, PHMG, cloruro de benzalconio, cetrimida, cloruro de hexadecilpiridinio, triclosan, hexaclorofeno y clorhexidina (Grande Burgos et al., 2013). Corcoran et al., (2014) mostraron que los biofilms de *Salmonella* sobrevivieron a la desinfección con hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio y cloruro de benzalconio incluso después de estar 90 minutos en contacto. En otro estudio (Er et al., 2014) se demostró que las cepas de *Salmonella* formando biofilms sobre bolitas de vidrio eran más resistentes a diversos conservantes químicos (nitrito sódico, sorbato potásico, benzoato sódico, metil parabeno y propil parabeno). Debido a la capacidad de formación de biofilm, cabría esperar que las cepas de *Salmonella* aisladas de cáscaras de huevo de gallina tuvieran mayor posibilidad de soportar la desinfección en ambientes de procesamiento de huevos.

Las cepas de *Salmonella* aisladas en el presente estudio fueron inhibidas por carvacrol y timol, siendo el segundo más eficaz. La sensibilidad a los compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales es interesante, ya que estos compuestos podrían ser incorporados en procesos de desinfección. En un estudio previo se ha demostrado la eficacia de soluciones de lavado con carvacrol, eugenol o trans-cinamaldehído en la inactivación de *Salmonella* en la superficie de huevos (Upadhyaya et al., 2013). En otro estudio posterior de los mismos autores, se demostró la eficacia frente a *Salmonella* de recubrimientos conteniendo concentraciones del 0.25% al 0.75% de carvacrol, eugenol, o ácido β -resorcílico (Upadhyaya et al., 2016). También hay un interés creciente en la aplicación de aceites esenciales para prevenir o reducir la colonización de patógenos transmitidos por los alimentos en animales de granja. Investigaciones recientes han demostrado un efecto antimicrobiano significativo para varios aceites esenciales y compuestos presentes en aceites esenciales frente a

microorganismos enteropatógenos en animales de granja (Bento et al., 2013; Doyle y Erickson 2012; Franz et al., 2010). En el caso del carvacrol y timol, algunos estudios han descrito efectos beneficiosos tras la adición de estos compuestos en la alimentación de aves de corral (Lee et al., 2003; Tiihonen et al., 2010; Du et al., 2016).

Otra familia de sustancias antimicrobianas utilizadas en animales de granja son las polimixinas. Dentro de los Estados miembros de la UE, la colistina (polimixina E) y la polimixina B están autorizadas a nivel nacional para uso en medicina veterinaria (EMA, 2013). La colistina se utiliza en gallinas ponedoras. En el presente estudio, la mayoría de los aislados (un 66,67%) necesitaron concentraciones altas de polimixina B (16 mg/l) para su inhibición. En un estudio previo (Poppe et al., 1996), la mayoría de los aislados de *Salmonella* fueron clasificados como sensibles a la polimixina B (CIM \leq 2 mg/l), mientras que sólo unos pocos fueron clasificados intermedios (8 mg/l) o resistentes (\geq 16 mg/l). Las bacterias Gram-negativas han desarrollado varias estrategias para protegerse de antibióticos como las polimixinas (polimixina B y colistina), incluyendo una variedad de modificaciones en el lipopolisacárido (LPS), tales como modificaciones del lípido A con fosfoetanolamina o con 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa, además del uso de bombas de exporte, la formación de cápsulas y la sobreexpresión de la proteína de membrana externa OprH (Olaitan et al., 2014).

Recientemente se ha descrito un gen de resistencia a la colistina (*mcr-1*) transferible mediante plásmidos tanto en cepas de *E. coli* y *S. enterica* como en el microbioma del intestino humano (Hu et al., 2016; Liu et al., 2016). La resistencia a la colistina plantea preocupaciones serias que obligan a reconsiderar el tratamiento sistémico con colistina aplicado en entornos hospitalarios para controlar los brotes recientes de enterobacterias productoras de carbapenemasa y especies como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* resistentes a múltiples fármacos (EMA, 2013). La resistencia a la colistina también confiere resistencia a una gama de otros péptidos catiónicos (EMA, 2013). De hecho, las cepas aisladas en el presente estudio que requerían altas concentraciones de polimixina B para su inhibición, también eran resistentes a las combinaciones de lisozima-EDTA ensayadas, e inversamente, la mayoría de los aislamientos sensibles a la polimixina B (tales como UJAS9, UJAS10, UJAS30 y UJAS38) eran también sensibles a las combinaciones de lisozima-EDTA.

La mayoría de las cepas aisladas también eran sensibles a bajas concentraciones de fosfato trisódico, que era eficaz en concentraciones mucho más bajas en comparación con el lactato sódico. El uso de fosfato trisódico (8-12%) está aprobado por la FDA de los Estados Unidos en plantas de procesamiento de aves como sustancia GRAS (generalmente reconocida como segura) (Federal Register, 1994). Además, el Grupo de expertos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre aditivos alimentarios, aromatizantes, aditivos tecnológicos y materiales en contacto con alimentos declaró que la descontaminación de la cáscara de huevo de aves de corral con fosfato trisódico en las condiciones de uso aprobadas por la FDA no plantea ningún riesgo toxicológico para la salud humana (EFSA, 2005). En conclusión, el fosfato trisódico podría ser un antimicrobiano alternativo con el fin de evitar la co-selección de la resistencia a los antibióticos por el uso masivo de biocidas.

Por otro lado los resultados del presente estudio indican una baja incidencia de *E. coli* en la superficie de los huevos vendidos al por menor, de forma similar a como se ha descrito en un estudio previo por Chousalkar et al., (2010) en huevos producidos en Australia. Sin embargo, varios aislados dieron positivo en la detección de factores de virulencia, un hecho que plantea cierta preocupación sobre la posible transmisión de cepas virulentas a través de la cadena alimentaria. En particular, se obtuvieron resultados positivos en el cribado para diferentes genes de toxinas. El gen *astA* que codifica para enterotoxinas termoestables EAST-1 (Savarino et al., 1993) se detectó en todas las cepas aisladas. Este gen se encuentra ampliamente distribuido en las cepas diarreogénicas según Fujioka et al., (2013). El papel del gen *astA* en la patogenicidad de *E. coli* no parece estar bien definido, aunque Yatsuyanagi et al., (2003) demostraron que una cepa que albergaba el gen *astA* estaba asociada con un brote de diarrea en Japón. La incidencia del gen *esth* para la enterotoxina termoestable asociada a cepas ETEC se detectó con baja frecuencia. Un estudio previo de 35 aislados de *E. coli* de la superficie de la cáscara de huevo demostró que cuatro aislados llevaban genes para enterotoxinas termoestables (Chousalkar et al., 2010). Además, los resultados de nuestro estudio indican que cuatro aislados mostraron un genotipo compatible con el fenotipo STEC (tres de ellos dieron positivo para *stx2* y uno para *stx*). Cabe esperar que la aplicación de tratamientos por calor durante el procesamiento de los alimentos reduzca el riesgo de transmisión de este patógeno así como de sus toxinas, pero aun así cabe la posibilidad de que algunas enterotoxinas termoestables puedan permanecer en el alimento si se

producen en etapas anteriores durante el procesado (Harbrecht y Bergdoll, 2006). Las cepas EPEC típicas poseen los genes para factores de adherencia *eae* y los pelos formadores de penachos (*bfpA*), mientras que las cepas EPEC atípicas poseen sólo el gen *eae* (Yatsuyanagi et al., 2002). Los resultados del presente estudio sugieren que la mayoría de las cepas que resultaron positivas para *eae* serían cepas EPEC atípicas. No obstante, sería interesante estudiar las variantes alélicas de los genes *eae* detectados.

Cabe esperar que aquellas cepas con mayor tolerancia a los procesos de desinfección, tengan mayores posibilidades de pasar a la cadena alimentaria a través de las superficies de cáscara de huevo. No obstante, los resultados del presente estudio indican una baja incidencia de la tolerancia a biocidas en las cepas de *E. coli* estudiadas, a excepción de HDP y P3 Oxonia. El HDP se ha ensayado para reducir la prevalencia de *E. coli* O157 en la piel de las vacas en una planta de procesado de carne de ternera (Bosilevac et al., 2004) y para la descontaminación de piezas de pollo y de carne de pollo en mataderos de aves (Chen et al., 2014; Xiong et al., 1998; Yang et al., 1998). Como se ha comentado más arriba, el HDP está autorizado para uso en carne fresca de aves (Food and Drug Administration, 2004). Las cepas tolerantes a P3 Oxonia aisladas en el presente estudio fueron capaces de crecer a concentraciones del 0,75%. Esta solución de desinfectante comercial se utiliza frecuentemente en la industria de alimentos a concentraciones que pueden variar entre 0,05 hasta 5%. Las cepas de *E. coli* pueden sobrevivir a procesos de desinfección con P3 Oxonia si la solución del biocida se utiliza a concentración demasiado bajas o si se diluye accidentalmente con líquidos residuales en ciertos puntos de las líneas de procesado de alimentos. Lo mismo podría suceder para cepas tolerantes a otros biocidas. Sin embargo, los niveles de tolerancia que aparecieron fueron siempre bajos, nunca superiores a 75 mg/l.

Los resultados obtenidos para las cepas de *E. coli* aisladas de huevo revelaron una mayor incidencia de resistencia a los antibióticos ampicilina, estreptomicina y tetraciclina (37,04%), y una menor incidencia de resistencia al ácido nalidíxico (18,51%), TM/STX (14,81%) o cloranfenicol (11,11%). Musgrove et al., (2006) describieron resistencia a tetraciclina (29,9%) y a estreptomicina (6,2%) en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de cáscara de huevo recogidas en 3 plantas comerciales. Sin embargo, sólo el 1% de las cepas aisladas de *E. coli* fueron resistentes a 4 agentes antimicrobianos. Un estudio sobre la resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli*

aisladas de heces de pollos de engorde en España (Sáenz et al., 2001) reveló porcentajes más altos de resistencia para el ácido nalidíxico (88%), tetraciclina (75%), trimetoprim-sulfametoxazol (65%), ampicilina (58 %), o ciprofloxacina (38%), y también una incidencia mucho menor de la resistencia al cloranfenicol (12%). Otro estudio describió que, en el período 1992-1993, el 7% de cepas de *E. coli* procedentes de pollos sanos en España eran resistentes a la ciprofloxacina (Blanco et al., 1997). Cabe destacar que también se ha descrito una elevada resistencia a la ciprofloxacina (49%) en cepas de *E. coli* aisladas de pavos en los Países Bajos (Van den Bogaard et al., 1997). Los autores de este último estudio comentaron que en ese momento la enrofloxacin (una quinolona similar a la ciprofloxacina, utilizada en medicina veterinaria) se utilizaba comúnmente para los pavos. Sin embargo, todos los aislados del presente estudio fueron sensibles a este antibiótico. Por otra parte, también fueron sensibles a imipenem, ceftazidima o cefotaxima, de forma similar a los resultados descritos en el estudio de Sáenz et al., (2001).

Existe una preocupación porque el uso de biocidas en la industria alimentaria pueda co-seleccionar para la resistencia a los antibióticos. De acuerdo con estudios previos, en diferentes cepas de *E. coli*, la adaptación por exposición gradual a QACs se asoció con una reducción en la susceptibilidad a los antibióticos, especialmente a compuestos fenólicos (Langsrud et al., 2004; Soumet et al., 2012). La adaptación al cloruro de benzalconio también modificó en un orden de hasta 4 veces la sensibilidad a otros antibióticos como quinolonas (ciprofloxacina, nalidíxico), betalactámicos (ampicilina, ceftazidima, cefotaxime) y tetraciclina (Soumet et al., 2012). En otro estudio (Braoudaki y Hilton, 2004) se demostró que *E. coli* O157:H7 adaptada a cloruro de benzalconio mostraba resistencia cruzada no sólo a los compuestos fenólicos, sino también a otros antibióticos (ampicilina, tetraciclina, trimetoprim). Además, la cepa de *E. coli* K-12 adaptada gradualmente a cloruro de benzalconio mostró un aumento de tolerancia a los aminoglucósidos gentamicina y estreptomina (Bore et al., 2007). Otro estudio puso de manifiesto la presencia de un fenotipo de resistencia múltiple a cloruro de benzalconio y a los antibióticos ampicilina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol (2004). Aunque los resultados del presente estudio indican una baja incidencia de la tolerancia a biocidas, preocupa la presencia de resistencias múltiples detectada en algunas de las cepas tolerantes a biocidas.

Los resultados del presente estudio indican una baja incidencia de los determinantes genéticos implicados en la tolerancia a los QACs en las cepas de *E. coli* estudiadas. Se detectó la resistencia QACs determinada por *qacA/B* en tres aislados, aunque sólo uno de ellos era tolerante al cloruro de benzalconio. Sin embargo, todos ellos dieron positivos también para genes de resistencia a la tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(E)*] y dos dieron positivo para el gen de resistencia a beta-lactamasa *bla_{CTX-M-2}*. Sorprendentemente, el gen *bla_{CTX-M-2}* fue el segundo con una incidencia más alta (22,22%) en los aislados estudiados después de *tet(A)* (29,63%) y *tet(B)* (29,63%). La amplia distribución de los determinantes genéticos para beta-lactamasas de espectro extendido (ESBL) en la cadena alimentaria es un asunto de interés (Woerther et al., 2013), aunque sería necesario realizar más estudios para investigar más profundamente si existe una posible asociación con los determinantes genéticos de resistencia a QAC. En dos de las cepas aisladas se detectó el gen *qacE* de resistencia a QAC, una de las cuales también llevaba el gen de resistencia a la sulfonamida *sulI*. La variante *qacEΔ1* de *qacE* suele estar vinculada genéticamente con los integrones de clase I que portan genes que codifican para la resistencia a las sulfonamidas y a otros antibióticos. Los integrones de clase I han sido descritos en cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes (incluyendo STEC) (Singh et al., 2005). De hecho, Zou et al., (2014) describieron que los genes *qacEΔ1* están altamente asociados con fenotipos de resistencia a múltiples fármacos y con los valores de CMI más altos frente a desinfectantes en cepas de *E. coli* aisladas de carnes al por menor. Sin embargo, *qacEΔ1* no se ha detectado en nuestro ensayo. Además, los experimentos de amplificación por PCR con un cebador directo para *qacE* y un cebador inverso *sulI* no dieron ningún producto de amplificación, lo que sugiere que los dos determinantes genéticos no estaban físicamente cercanos, a diferencia de los integrones de clase I. Además, no se detectó el gen *intl* de la integrasa asociada con integrones de clase I.

Los genes para tolerancia a biocidas detectados con mayor frecuencia fueron los relacionados con bombas de exporte, incluyendo *acrB*, *mdfA*, y, en menor medida *oqxA*. La tolerancia a biocidas está mediada en la mayoría de los casos por bombas de exporte, la mayoría de las cuales tienen una amplia especificidad de sustrato (Poole, 2007). En el presente estudio, los genes para bombas de exporte se encontraron en cepas que también llevan genes de resistencia a betalactámicos (*bla_{PSE}*, *bla_{CTX-M-2}*), tetraciclinas (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(E)*) o sulfonamidas (*sulI*).

Un objetivo adicional del presente estudio fue determinar si había alguna correlación entre la tolerancia a biocidas o la resistencia a los antimicrobianos detectadas en las cepas de *E. coli* estudiadas con el grado de sensibilidad a otros antimicrobianos comúnmente utilizados en la industria alimentaria o conocidos por reducir la contaminación microbiana en alimentos, como el lactato sódico, fosfato trisódico, o diferentes combinaciones de lizozima-EDTA (Demirci y Ngadi, 2012). Los resultados mostraron que las diferencias en la sensibilidad de las cepas a estos antimicrobianos no se correlacionaban con la tolerancia a biocidas y la resistencia a los antibióticos. De hecho, la cepa aislada multi-resistente UJAEc9 mostró una alta sensibilidad al lactato sódico, fosfato trisódico y a la lizozima-EDTA. Curiosamente, la sensibilidad a lizozima-EDTA fue mayor para aquellas combinaciones que tenían mayor concentración de EDTA. Tanto el EDTA como el fosfato trisódico actúan como quelantes, secuestrando cationes divalentes que pueden ser esenciales para la estabilidad de la membrana bacteriana externa y/o como micronutrientes. Sin embargo, el fosfato trisódico puede ser un conservante mejor, ya que es activo frente a todos los aislados ensayados en concentraciones relativamente bajas, mientras que muchas cepas aisladas toleran todas las combinaciones de lizozima-EDTA analizadas (incluyendo tres de las presuntas cepas STEC).

El carvacrol y timol son compuestos antimicrobianos que se pueden encontrar de forma natural en aceites esenciales (Burt, 2004). Hay un creciente interés en el uso de aceites esenciales o de sus componentes bioactivos como inhibidores frente a la transmisión de patógenos transmitidos por alimentos a través de la cadena alimentaria (Doyle y Erickson, 2012; Seow et al., 2014). De acuerdo con los resultados del presente estudio, el timol sería preferible al carvacrol, dado que su actividad antimicrobiana mayor frente a los aislados de *E. coli*. Ni la sensibilidad al carvacrol ni al timol parecen estar influenciadas por la tolerancia a biocidas o la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, para desarrollar las posibles aplicaciones de timol como inhibidor frente a *E. coli* en la industria aviar necesitaríamos estudiar cómo aumentar su eficacia en la superficie del huevo (por ejemplo, incorporándolo en un proceso de lavado o en un recubrimiento activo como en el caso de *Salmonella*).

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio revelan la presencia de cepas de bacterias lácticas tolerantes a biocidas y resistentes a antibióticos en las pequeñas y medianas empresas dedicadas a la producción de leche de vaca o a la elaboración de queso de cabra.
2. Los ambientes de procesado de las empresas lácteas estudiados contienen bacterias lácticas portadoras de genes de tolerancia a biocidas y de resistencia a antibióticos.
3. También contienen enterobacterias tolerantes a biocidas y resistentes a antibióticos, destacando una cepa multirresistente de *Enterobacter cloacae*.
4. Algunas de las enterobacterias tolerantes a biocidas y resistentes a antibióticos de los ambientes lácteos portan genes de resistencia típicos de los integrones de clase I.
5. En las cepas multirresistentes de *Salmonella* aisladas de huevo de gallina se ha encontrado una correlación positiva significativa entre la resistencia a ciprofloxacino, cefotaxima y ceftazidima y la tolerancia a biocidas como cloruro de benzalconio, cetrimida, cloruro de hexadecilpiridinio o triclosan.
6. El estudio de los determinantes genéticos sugiere que la tolerancia a biocidas detectada en *Salmonella* no se debe a la adquisición de genes de resistencia, sino más bien a adaptaciones de tipo inespecífico.
7. La capacidad de formación de biopelículas detectada en las cepas de *Salmonella* estudiadas podría ser un factor adicional que incremente su resistencia a los procesos de desinfección.
8. Las cepas de *E. coli* aisladas de huevo representan un riesgo para la salud ya que pueden ser portadoras de genes para la producción de enterotoxinas.
9. Las cepas de *E. coli* aisladas de huevo presentan bajos niveles de tolerancia a biocidas, pero algunas de ellas presentan resistencias múltiples a biocidas y antibióticos.
10. La exposición a biocidas podría co-seleccionar resistencias a antibióticos en los ambientes estudiados.

11. El carvacrol, el timol, así como el fosfato trisódico, podrían ser una alternativa a los biocidas para evitar la co-selección de cepas resistentes a antibióticos.

CONCLUDING REMARKS

1. Results of this study revealed the presence of biocide-tolerant, antibiotic-resistant strains of lactic acid bacteria in the small-medium enterprises involved in production of raw cow milk and goat milk cheese.
2. The dairy food processing environments investigated harbor lactic acid bacteria that carry genetic determinants for biocide tolerance and antibiotic resistance.
3. They also harbor biocide-tolerant, antibiotic-resistant enterobacteria, such as the outstanding multiresistant strain of *Enterobacter cloacae* detected.
4. Some of the biocide-tolerant, antibiotic-resistant enterobacteria from dairy environments carry resistance determinants typically found in class I integrons.
5. There is a positive correlation between resistance to ciprofloxacin, cefotaxime and ceftazidime and tolerance to biocides such as benzalkonium chloride, cetrimide, hexadecylpyridinium chloride or triclosan in the multiresistant *Salmonella* strains isolated from hen eggshells.
6. The study of genetic determinants suggests that the detected biocide tolerance in *Salmonella* is the result of non-specific adaptations rather than acquisition of specific resistance genes.
7. The biofilm-forming capacity detected in *Salmonella* isolates could be an additional factor increasing resistance to disinfection processes.
8. *E. coli* strains isolated from hen eggshells can pose a health risk since they may carry genes for enterotoxin production.
9. *E. coli* strains isolated from hen eggshells show low levels of biocide tolerance, but some of them are multiply resistant to biocides and antibiotics.
10. Exposure to biocides could co-select for antibiotic resistance in the food processing facilities investigated.

11. Carvacrol, thymol, as well as trisodium phosphate, could be an alternative to biocides in order to avoid co-selection of antibiotic-resistant strains.

REFERENCIAS

Aarestrup, F.M. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents* 12:279–285.

Aarestrup, F.M., Kruse, H., Tast, E., Hammerum, A.M., Jensen, L.B. 2000. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microb Drug Resist* 6:63–70.

Aarestrup, F.M., Hasman, H. 2004. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet Microbiol* 100:83–89.

Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. 2008. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int J Food Microbiol* 127:200–208.

Adesiyun, A., Offiah, N., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V., Musai, L. 2007. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs. *Food Cont* 18:306–311.

Agarwal, A., Awasthi, V., Dua, A., Ganguly, S., Garg, V., Marwaha, S.S. 2012. Microbiological profile of milk: impact of household practices. *Indian J Public Health* 56:88–94.

Aguhob, S., Astell, B. 1998. *Procesamiento de Lácteos*. Editorial Lima ITDG.

Al-Ajeeli, M.N., Taylor, T.M., Alvarado, C.Z., Coufal, C.D. 2016. Comparison of eggshell surface sanitization technologies and impacts on consumer acceptability. *Poult Sci* 95:1191–1197.

Alekshun, M.N., Levy, S.B. 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol* 7:410–413.

Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251–259.

Allen, H.K., Stanton, T.B. 2014. Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. *Annu Rev Microbiol* 68:297–315.

Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. 2009. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Cont* 20:1108–1111.

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

Aminov, R.I., Mackie, R.I. 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 271:147–61.

Aminov, R.I. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* 11:2970–2988.

Ammor, M.S., Flórez, A.B., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 24:559–570.

Ammor, M.S., Florez, A.B., van Hoek, A.H., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Aarts, H.J., Margolles, A., Mayo, B. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14:6–15.

Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1818–1824.

Andersson, D.I. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6:452–456.

Antunes, P., Réu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 82:97–103.

Arioli, S., Elli, M., Ricci, G., Mora, D. 2013. Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *Int J Food Microbiol* 163:1–5.

Arvanitidou, M., Tsakris, A., Sofianou, D., Katsouyannopoulos, V. 1998. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. *Int J Food Microbiol* 40:197–201.

Ayres, J.C., Kraft, A.A., Board, R.G., Torrey, G.S., Rizk, S.S. 1967. Sanitation practices in egg handling and breaking plants and the application of several disinfectants for sanitizing eggs. *J Appl Microbiol* 30:106–116.

Bachmann, H., Starrenburg, M.J.C., Molenaar, D., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T. 2012. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Res* 22:115–124.

Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M., Hoiby, N., 2004a. Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1168–1174.

Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P., Hoiby, N. 2004b. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1175–1187.

Bartoszcz, M. 2009. Bacteria in the state of VBNC - A threat to human health. *Med Vet* 65:228–231.

Bbosa, G.S., Mwebaza, N. 2013. Global irrational antibiotics/antibacterial drugs use: A current and future health and environmental consequences, In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. A. Méndez-Vilas, Ed. Formatex Research Center. Vol. 3. pp. 1645–1655.

Bbosa, G.S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D.B., Ntale, M. 2014. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health* 6:410–425.

Beier, R.C., Poole, T.L., Brichta-Harhay, D.M., Anderson, R.C., Bischoff, K.M., Hernandez, C.A., Bono, J.L., Arthur, T.M., Nagaraja, T.G., Crippen, T.L., Sheffield, C.L., Nisbet, D.J. 2013. Disinfectant and antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* O157:H7 strains from cattle carcasses, feces, and hides and ground beef from the United States. *J Food Prot* 76:6–17.

Bento, M.H.L., Ouwehand, A.C., Tiihonen, K., Lahtinen, S., Nurminen, P., Saarinen, M.T., Fischer, J. 2013. Essential oils and their use in animal feeds for

monogastric animals – Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. *Vet Med* 58:449–458.

Berry, J.T., Doyle, M.P., Schoeni, J.L. 1985. Colonization of chicken caeca by *E. coli* associated with haemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol* 49:310–315.

Beutlich, J., Jahn, S., Malorny, B., Hauser, E., Hühn, S., Schroeter, A., Rodicio, M.R., Appel, B., Threlfall, J., Mevius, D., Helmuth, R., Guerra, B. 2011. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* Isolates from different origins. *Appl Environ Microbiol* 77:5655–5664.

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13:42–51.

Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J. 1997. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J Clin Microbiol* 35:2184–2185.

Blenkinsopp, S.A., Costerton, J.W. 1991. Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnol.* 9:138–143.

Board, R.G., Tranter, H.S. 1995. The microbiology of eggs. In: Stadelman WJ, Cotterill OJ, editors. *Egg science and technology*. Food Products Press, NY. pp. 81–103.

Boddie, R.L., Nickerson, S.C., Adkinson, R.W. 1997. Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *J Dairy Sci* 80:2809–2814.

Bonizzi, I., Buffoni, J.N., Feligini, M., Enne, G. 2009. Investigating the relationship between raw milk bacterial composition, as described by intergenic transcribed spacer-PCR fingerprinting, and pasture altitude. *J Appl Microbiol* 107:1319–1329.

Bore, E., Hebraud, M., Chafsey, I., Chambon, C., Skjaeret, C., Moen, B., Moretro, T., Langsrud, O., Rudi, K., Langsrud, S. 2007. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiol* 153:935–946.

Bosilevac, J.M., Arthur, T.M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Rossman, M., Reagan, J.O., Koohmaraie, M. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* are reduced when hides are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. *J Food Prot* 67:646–650.

Bottone, E.J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 23:382–398.

Boyd, D.A., Peters, G.A., Ng, L., Mulvey, M.R. 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 189:285–291.

Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckaert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., Mulvey, M.R. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona *J Bacteriol* 183:5725–5732.

Braem, G., De Vliegher, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., De Vuyst, L. 2012. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet Microbiol* 157:383–390.

Braoudaki, M., Hilton, A.C. 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 42:73–78.

Braoudaki, M., Hilton, A.C. 2004. Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* 253:305–309.

Briggs, C.E., Fratamico, P.M. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 43:846–849.

Bristol Lab Int 1960. Compositions for increasing efficiency of animal nurture. UK Patent No. 848925 A.

Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A. 2012. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *Int J Antimicrob Agents* 39:381–389.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94:223–253.

Buxton, J., Fyfe, M., King, A., Paccagnella, A., Campbell, K., Ellis, A. 1999. Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infection in the United States and Canada associated with unpasteurized orange juice—the British Columbia Experience. *Canada Communicable Dis Report* 25:161–164.

Caleja, C., de Toro, M., Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D., Rodrigues, J., Yolanda Sáenz, Y., Carvalho, C., Igrejas, G., Torres, C., Poeta, P. 2011. Antimicrobial resistance and class I integrons in *Salmonella enterica* isolates from wild boars and Bísaro pigs. *Int Microbiol* 14:19–24.

Callon, C., Duthoit, F., Delbes, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Cremoux, R., Montel, M.C. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Syst Appl Microbiol* 30:547–560.

Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* 50:131–149.

Carpentier, B., Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 75:499–511.

Carsberg, H.C. 2003. Food plant sanitation. In: *Food safety handbook*. Schmidt RH, and Rodrick GE (eds.). Wiley- Interscience, NJ Hoboken, pp 383–402.

Ceragioli, M., Mols, M., Moezelaar, R., Ghelardi, E., Senesi, S., Abee, T. 2010. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Appl Environ Microbiol* 76:3352–3360.

Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. 2010. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “resistance” has different meanings. *Int J Food Microbiol* 136:247–254.

Chamba, J.F., Irlenger, F. 2004. Secondary and Adjunct Cultures Cheese: *Chemist Phys Microbiol* 1:191–206.

Chapman, J.S. 2003 Biocide resistance mechanisms *Int Biodet Biodeg* 51:133–138.

Chee-Sanford, J.C., Krapac, I.J., Yannarell, A.C., Mackie, R.I. 2013. Environmental Impacts of Antibiotic Use in the Animal Production Industry (Chapter 29). In: *Prevention of Infectious Diseases in Livestock and Wildlife*, pp. 228–239.

Chen, X., Bauermeister, L.J., Hill, G.N., Singh, M., Bilgili, S.F., McKee, S.R. 2014. Efficacy of various antimicrobials on reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* and quality attributes of ground chicken obtained from poultry parts treated in a postchill decontamination tank. *J Food Prot* 77:1882–1888.

Chia, T.W., Goulter, R.M., McMeekin, T., Dykes, G.A., Fegan, N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiol* 26:853–859.

Chousalkar, K.K., Flynn, P., Sutherland, M., Roberts, J.R., Cheetham, B.F. 2010. Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *Int J Food Microbiol* 142:207–213.

Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R., Schweizer, H.P. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother* 45:428–432.

Cid, H., Carrillo, O., Bunster, M., Martínez, J., Vargas, V. 1988. The relationship between the structures of four beta-lactamases obtained from *Bacillus cereus*. *Arch Biol Med Exp* 21:101–107.

Cobb, S.P., Hogg, R.A., Challoner, D.J., Sharpe, R.T., Brett, M.M., Livesey, C.T., Jones, T.O. 2002. Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Vet Rec* 150:5–8.

Coburn, B., Grass, G.A., Finlay, B.B. 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 85:112–118.

Cochran, W.L., McFeters, G.A., Stewart, P.S. 2000. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 88:22–30.

Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., Comi, G. 2004. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *Int J Food Microbiol* 90:83–91.

Collignon, S., Korsten, L. 2010. Attachment and colonization by *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* on stone fruit surfaces and survival through a simulated commercial export chain. *J Food Prot* 73:1247–1256.

Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K.A., Walsh, C., Burgess, C., Fanning, S. 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Appl Environ Microbiol* 78:3087–3097.

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, Z. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmegiano Reggiona cheese. *Lait* 85:193–204.

Corcoran, M., Morris, D., De-Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., Cormican, M. 2014. Commonly Used Disinfectants Fail To Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. *Appl Environ Microb* 80:1507–1514.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Rev Microbiol* 49:711–745.

Cox, N.A., Richardson, L.J., Buhr, R.J., Musgrove, M.T., Berrang, M.E., Bright, W. 2007. Bactericidal effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella serovar* Typhimurium. *J Appl Poult Res* 16:623–627.

Crawford, R., Kristin, W., Reeve, E., Gunn, J.S. 2010. Flagellated but Not Hyperfimbriated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Attaches to and Forms Biofilms on Cholesterol-Coated Surfaces. *J Bacteriol* 192:2981–2990.

Crémet, L., Caroff, N., Dauvergne, S., Reynaud, A., Lepelletier, D., Corvec, S. 2011. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL

Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathol Biol* 59:151–156.

Cremonesi, P., Vanoni, L., Silveti, T., Morandi, S., Brasca, M. 2012. Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *J Dairy Res* 79:318–323.

D'Aoust, J.Y., Maurer, J. 2007. *Salmonella* species. In: M.P. Doyle and L.R. Beuchat. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3rd edition), ASM Press. pp. 187-236.

Da Silva, M.V., Gibbs, P.A., Kirby, R.M. 1998. Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *J Appl Microbiol* 84:802–810.

Danese, P.N., Pratt, L.A., Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 182:3593–3596.

Davey, M.E., O'toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Molec Biol Rev* 64:847–867.

Davies, R.H., Breslin, M. 2003. Investigation of *Salmonella* contamination and disinfection in farm egg-packing plants. *J Appl Microbiol* 94:191–196.

De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., Heyndrickx, M. 2011. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl Environ Microbiol* 77:460–470.

De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Int J Food Microbiol* 112:253–260.

De Toro, M., Sáenz, Y., Cercenado, E., Rojo-Bezares, B., García-Campello, M., Undabeitia, E., Torres, C. 2011. Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *Int Microbiol* 14:173–181.

Demirci, A., Ngadi, M.O. 2012. *Microbial Decontamination in the Food Industry: Novel Methods and Applications*. Woodhead Publishing SLTD., Cambridge.

Denyer, S.P. 1995. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int Biodet Biodeg*, 36:227–245.

Devirgiliis, C., Zinno, P., Perozzi, G. 2013. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front Microbiol* 4:301.

Devriese, L.A., Hommez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P., Haesebrouck, F. 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol* 70: 87–94.

Dewaele, I., Van Meirhaeghe, H., Rasschaert, G., Vanrobaeys, M., De Graef, E., Herman, L., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., De Reu, K. 2012. Persistent *Salmonella enteritidis* environmental contamination on layer farms in the context of an implemented national control program with obligatory vaccination. *Poultry Sci* 91:282–291.

Dhanashekar, R., Akkinapalli, S., Nellutla, A. 2012. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *Germs* 2:101–109.

Dibner, J.J., Richards, J.D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 84:634–643.

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

Dijkshoorn, L. 2013. *Acinetobacter baumannii*. *Molecular Typing in Bacterial Infections* (de Filippis I & McKee ML, ed.), Humana Press Inc., New York. pp. 433–456.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193.

Donnelly, C.W. 2004. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. *Cheese: Chemist Phys Microbiol* 2:541–559.

Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M.R., Cloeckert, A. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol* 55:1911–1924.

Doyle, M.P., Erickson, M.C. 2012. Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *Int J Food Microbiol* 152:54–74.

Doyle, M.P., Loneragan, G.H., Scott, H.M., Singer, R.S. 2013. Antimicrobial resistance: challenges and perspectives. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 12:234–248.

Driehuis, F. 2013. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agric Food Sci* 22:16–34.

Du, E., Wang, W., Gan, L., Li, Z., Guo, S., Guo, Y. 2016. Effects of thymol and carvacrol supplementation on intestinal integrity and immune responses of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J An Sci Biotech* 22:7–19.

Duffy, G., Cloak, O.M., O’Sullivan, M.G., Guillet, A., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. 1999. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on Irish retail meat products. *Food Microbiol* 16:623–631.

Dunne, W.M. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin Microbiol Rev* 15:155–166.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2012. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012. Available from <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf>.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2013. Epidemiological update: multistate outbreak of *Salmonella* Stanley infection, 30 January 2013. Published 7 Feb 2013. Available at http://www.ecdc.europa.eu/en/press/news/Lists/News/ECDC_DisForm.aspx?List=32e43ee8-e230-4424-a783-85742124029a&ID=838.

Edgar, R., Bibi, E. 1997. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J Bacteriol* 179:2274–2280.

EFSA (European Food Safety Authority). 2005. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. *EFSA J* 297:1–27.

EFSA (European Food Safety Authority). 2007. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus. EFSA J 97:1–84.

EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Food Safety Authority on food borne antimicrobial resistance as a biological hazard. EFSA J 765:1–87.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004–2007. EFSA J 8:1309, 306 pp.

EFSA (European Food Safety Authority). 2011. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA J 9:2154.

EFSA (European Food Safety Authority). 2012. Scientific Report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA J 10:2597.

EFSA (European Food Safety Authority). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and food-borne outbreaks in 2013. 165 pp. EFSA J 13:3991.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2013. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. EFSA J 11:3196.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2013a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA J 11:3129,250 pp.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA J 13:3991,165 pp.

Elliott, S.D., Barnes, E.M. 1959. Changes in serological type and antibiotic resistance of Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. *J Gen Microbiol* 20:426–33.

Er, B., Demirhan, B., Kaynak Onurdağ, F., Özgen Ozgacar, S., Bayhan Öktem, A. 2014. Antimicrobial and antibiofilm effects of selected food preservatives against *Salmonella* spp. isolated from chicken samples. *Poult Sci* 93:695–701.

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol* 26:228–231.

Erickson, B.D., Elkins, C.A., Mullis, L.B., Heinze, T.M., Wagner, R.D., Cerniglia, C.E. 2014. A metallo- β -lactamase is responsible for the degradation of ceftiofur by the bovine intestinal bacterium *Bacillus cereus* P41. *Vet Microbiol* 172:499–504.

EMA (European Medicine Agency). 2013. Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health.

European Union, 2016. Commission implementing decision (EU) 2016/110 of 27 January 2016 not approving triclosan as an existing active substance for use in biocidal products for product- type 1 (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union* L 21/87.

Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G., Chilmonczyk, S., Eldar, A. 2004. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Appl Environ Microbiol* 70:5132–5137.

Fábrega, A., Vila, J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26:308–41.

Fantanatti, F., Silveria, W.D., Castro, F.P. 1994. Characteristics associated with pathogenicity of avian pathogenic *E. coli* strains. *Vet Microbiol* 41:75–86.

Federal Register, 1994. Use of trisodium phosphate on raw, chilled poultry carcasses. *Fed Regist* 59:551–554.

Fernández-Fuentes, M.A., Ortega, E., Abriouel, H., Pérez, R., Gálvez, A. 2012. Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics. *Food Cont* 26:73–78.

Fernández-Fuentes, M.A., Abriouel, H., Ortega, E., Pérez, R., Gálvez, A. 2014. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. *Int J Food Microbiol* 172:49–56.

Fernández Fuentes, M.A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. 2014. Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide resistant gram-negative bacteria from organic foods. *Food Control* 37:9–14.

Finley, R.L., Collignon, P., Larsson, D.G., McEwen, S.A., Li, X.Z., Gaze, W.H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D.W., Topp, E. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis* 57:704–710.

Flórez, A.B., Delgado, S., Mayo, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can J Microbiol* 51:51–58.

Flórez, A.B., Ammor, M.S., Mayo, B., van Hoek, A.H., Aarts, H.J., Huys, G. 2008. Antimicrobial susceptibility profiles of 32 type strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* and *Streptococcus* spp. *Int J Antimicrob Agents* 31:484–486.

Flórez, A.B., Reimundo, P., Delgado, S., Fernández, E., Alegría, A., Guijarro, J.A., Mayo, B. 2012. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* IPLA 31405, a bacteriocin-producing, tetracycline-resistant strain isolated from a raw-milk cheese. *J Bacteriol* 194:5118–119.

Flórez, AB., Mayo, B. 2015. Diversity and dynamics of antibiotic-resistant bacteria in cheese as determined by PCR denaturing gradient gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 214:63–69.

Flynn, W.T. 2012. The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. Center for Veterinary Medicine (HFV-1), Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services.

FDA (Food and Drug Administration). 2004. Department of Health and Human Services. 21 CFR Part 173.375. Federal Register/Vol. 69 No. 64/Friday, April 2, 2004/Rules and Regulations.

FDA (Food and Drug Administration). 2010. Questions and Answers on FDA's Draft Guidance on the Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals.

FDA (Food and Drug Administration). 2013. New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food-Producing Animals: Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209. Guidance #213.

FDA (Food and Drug Administration). 2015. 2014 summary report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals.

FDA (Food and Drug Administration). 2015. Veterinary Feed Directive; Final Rule. Federal Register vol 80, n° 6.

Frank, J.F. 2007. Milk and dairy products. In: M.P. Doyle and L.R. Beuchat. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers (3rd edition), ASM Press. pp. 141–155.

Franz, C., Baser, K.H.C., Windisch, W. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding a European perspective. A review. Flavour Frag J 25:327–340.

Fricker, M., Skanseng, B., Rudi, K., Stessl, B., Ehling-Schulz, M. 2011. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. Int J Food Microbiol 145:S24–S30.

Frye, J.G., Jackson, C.R. 2013. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. Front Microbiol 4:e135

Fujioka, M., Otomo, Y., Ahsan, C.R. 2013. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. J Microbiol Methods 92:289–292.

Fuller, R., Newland, L.G.M., Briggs, C.A.E., Braude, R., Mitchell, K.G. 1960. The normal intestinal flora of the pig. IV. The effect of dietary supplements of penicillin, chlortetracycline or copper sulphate on the faecal flora. J Appl Bacteriol 23:195–205.

Fuster, N. 2004. Los Biofilms en la Industria Alimentaria. Industria Alimentaria. sept-oct 2004. Alfa editores.

Futoma-Kołoch, B., Książczyk, M., Korzekwa, K., Migdał, I., Pawlak, A., Jankowska, M., Bugla-Płoskońska, G. 2015. Selection and electrophoretic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* biocide variants resistant to antibiotics. *Pol J Vet Sci* 18:725–732.

Gadea, R., Fernández Fuentes, M.A., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E. 2016. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Res Int* 85:131–143.

Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J., Van Immerseel, F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 33:718–738.

García Hurtado, M. 2013. Recepción y almacenamiento de la leche y otras materias primas. María García Hurtado. IC Editorial. 1ª Edición.

Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M., Wellington, E.M. 2005. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob Ag Chemother* 49:1802–1807.

Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., Swings, J. 2003. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl Environ Microbiol* 69:1270–1275.

Giakkoupi, P., Tzouveleki, L.S., Tsakris, A., Loukova, V., Soğanou, D., Tzelepi, E. 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A L-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2247–2253.

Giannella, R.A. 2006. Infectious enteritis and proctocolitis and bacterial food poisoning. In M.Feldman, L.S. Friedman, M.H. Sleisenger (Eds.), *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease* (8th ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.

Giguère, S. 2006. *Antimicrobial Drug Action and Interaction: An Introduction*. *Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine* 4th edn, S Giguère, JF Prescott, JD Baggot, RD Walker and PM Dowling, eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA.

Golding, G.R., Olson, A.B., Doublet, B., Cloeckert, A., Christianson, S., Graham, M.R., Mulvey, M.R. 2007. The effect of the *Salmonella* genomic island 1 on

in vitro global gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Microb Infect* 9:21-27.

Goldstein, E.J., Tyrrell, K.L., Citron, D.M. 2015. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis* 60:S98-107.

Graham, J.P., Boland, J.J., Silbergeld, E. 2007. Growth promoting antibiotics in food animal production: An economic analysis. *Public Health Reports* 122:79–87.

Grande Burgos, MJ., Lucas López, R., López Aguayo, MC., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. 2013. Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides. *Food Control* 30:214–221.

Grasso, E.M., Somerville, J.A., Balasubramaniam, V.M., Lee, K. 2010. Minimal effects of highpressure treatment on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium inoculated into peanut butter and peanut products. *J Food Sci* 75:522–526.

Gurung, M., Nam, H.M., Tamang, M.D., Chae, M.H., Jang, G.C., Jung, S.C., Lim, S.K. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *J Dairy Sci* 96:1997–2002.

Gustafson, R.H., Bowen, R.E. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *J Appl Microbiol* 83:531–541.

Hagi, T., Kobayashi, M., Nomura, M. 2010. Molecular-based analysis of changes in indigenous milk microflora during the grazing period. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:484–487.

Hammond, S.A., Morgan, J.R., Russell, A.D. 1987. Comparative susceptibility of hospital isolates of Gram-negative bacteria to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect* 9:255–264.

Hansen, L.H., Sorensen, S.J., Jorgensen, H.S., Jensen, L.B. 2005. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microb Drug Resis* 11:378–382.

Hansen, L.S., Jensen, L.B., Sorensen, H.I., Sorensen, S.J. 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* 60:145–147.

Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M. 2007. *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2344-2348.

Harbrecht, D.F., Bergdoll, M.S. 2006. Staphylococcal enterotoxin B production in hardboiled eggs. *J Food Sci* 45:307–309.

Harry, E.G., Hemsley, L.A. 1965. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicaemia. *Vet Rec* 77:35–40.

Harvey, M.J. 1965. Animal feed composition and method of using same. US Patent No. 3185573 A.

Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B.T., Scheie, A.A., Sunde, M., Yazdankhah, S.P. 2010. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist* 16:91–104.

Heintz, M.L., Ruble, R.D., Wagner, D.E., Tatini, S.R. 2000. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *J Food Prot* 63:579–592.

Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L. 1999. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J Appl Microbiol* 86:378–388.

Hernandez, A. 2003. *Microbiología Industrial*. Alicia Hernández Peñaranda. Editorial Uned.

Hernández, A.G., López, M.D.R. 2010. *Tratado de Nutrición*. 2a ed. Tomo II : Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos., Editorial Medica Panamericana.

Herrera-León, S., González-Sanz, R., Herrera-León, L., Echeita, M.A. 2011. Characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *J Antimicrob Chemother* 66:287–290.

Herreros, M., Sandoval, H., González, L., Castro, J., Fresno, J., Tornadijo, M. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol* 22:455–459.

Heuer, O.E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F.J. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* 49:1248–1253.

Heyndrickx, M., Scheldeman, P. 2002. Bacilli associated with spoilage in dairy and other food products. In: Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N. & De Vos, P. (eds.) *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. Oxford, UK, Blackwell Science. p. 64–82.

Ho, A.J., Ivanek, R., Gröhn, Y.T., Nightingale, K.K., Wiedmann, M. 2007. *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day to day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. *Prev Vet Med* 80:287–305.

Holah, J.T., Kearney, L.R. 1992. Introduction to biofilms in the food industry. In: *Biofilms: Science and Technology* (eds Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. & Capdeville, B), pp. 35-44.

Hopkins, K.L., Day, M., Threlfall, E.J. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 14:340–342.

Hu, Y., Liu, F., Lin, I.Y., Gao, G.F., Zhu, B. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:146–147.

Hughes, V.M., Datta, N. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature* 302:725–726.

Hussain, M., Carlino, A., Madonna, M.J., Lampen, J.O. 1985. Cloning and sequencing of the metallothionein b-lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 164:223–239.

Hutchison, M.L., Gittins, J., Walker, A., Sparks, N., Humphrey, T.J., Burton, C., Moore, A. 2004. An assessment of the microbiological risks involved with egg washing under commercial conditions. *J Food Prot* 67:4–11.

Hvistendahl, M. 2012. Public health. China takes aim at rampant antibiotic resistance. *Science* 336:795.

ICMSF, 1998. *Microbiología de los alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios*. Ed. Acribia.

Iturriaga, M.H., Escartín, E.F., Beuchat, L.R., Martinez-Peniche, R. 2003. Effect of inoculum size, relative humidity, storage temperature, and ripening stage on the attachment of *Salmonella* Montevideo to tomatoes and tomatillos. *J Food Prot* 66:1756-1761.

Jakobsen, L., Spangholm, D.J., Pedersen, K., Jensen, L.B., Emborg, H.D., Agerso, Y., Aarestrup, F.M., Hammerum, A.M., Frimodt-Moller, N. 2010. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int J Food Microbiol* 142:264–272.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. *Modern food microbiology*, 7th edition. Springer Science + Business Media. New York, NY.

Jindal, A., Kocherginskaya, S., Mehboob, A., Robert, M., Mackie, R.I. 2006. Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. *Appl Environ Microbiol* 72:7813–7820.

Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R.A., Bolton, F.J. 2002. Prevalence and number of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. *Int J Food Microbiol* 76:151–164.

Joseph, B., Otta, S., Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol* 64:367–372.

Joynson, J.A., Forbes, B., Lambert, R.J.W. 2002. Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. *J Appl Microbiol* 93:96–107.

Jukes, T.H., Stokstad, E.L.R., Taylor, R.R., Cunha, T.J., Edwards, H.M., Meadows, G.B. 1950. Growth-promoting effect of Aureomycin on pigs. *Arch Biochem* 26:324–325.

Jukes, T.H. 1952. Animal and poultry feed containing aureomycin mash. US Patent No. 2619420.

Jukes, T.H. 1977. The history of the “antibiotic growth effect”. *Fed Proc* 36:2514–2518.

Jun, W., Kim, M.S., Cho, B., Millner, P.D., Chao, K., Chan, D.E. 2010. Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. *J Food Engin* 99:314–322.

Kampf, G., Kramer, A. 2004. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clin Microbiol Rev* 17: 863–893.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140.

Karatzas, K.A.G., Webber, M.A., Jorgensen, F., Woodward, M.J., Piddock, L.J. V., Humphrey, T.J. 2007. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *J Antimicrob Chemother* 60:947–955.

Karatzas, K.A., Randall, L.P., Webber, M., Piddock, L.J., Humphrey, T.J., Woodward, M.J., Coldham, N.G. 2008. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 74:1508–1516.

Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Arai, T. 1998. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacE* delta 1 in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 165:295–299.

Kelton, D.F., Lissemore, K.D., Martin, R.E. 1998. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J Dairy Sci* 81:2502–2509.

Kenneth, S., McKeegan, M., Borges-Walmsley, I., Walmsley, A.R. 2002. Microbial and viral drug resistance mechanisms *Trend in Microbiol* 10:s8–s14.

Kim, Y.T., Jang, J.H., Kim, H.C., Kim, H., Lee, K.R., Park, K.S., Lee, H.J., Kim, Y.J. 2011. Identification of strain harboring both *aac(6′)-Ib* and *aac(6′)-Ib-cr* variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *BMB Rep* 44:262–266.

Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A., Graham, D.W. 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol* 44:580–587.

Krysinski, E.P., Brown, L.J., Marchisello, T.J. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J Food Prot* 55:246–251.

Kücken, D., Feucht, H.H., Kaulfers, P.M. 2000. Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 183:95–98.

Kuda, T., Yano, T., Kuda, M.T. 2008. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *LWT- Food Sci Technol* 41:988–993.

Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere* 75:435–441.

Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol* 70:5644–5650.

Lamas, A., Fernandez-No, I.C., Miranda, J.M., Vázquez, B., Cepeda, A., Franco, C.M. 2016. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from northwestern Spanish broiler flocks (2011–2015) *Poult Sci* 95:2097–2105.

Lambert, R.J.W., Joynson, J., Forbes, B. 2001. The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *J Appl Microbiol* 91:972–984.

Lampel, K.A., Al-Khaldi, S., Cahill, S.M. 2012. *Salmonella* species. In T. Hammack, *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins U.S. Food and Drug Administration*. pp. 12–16.

Langsrud, S., Sundheim, G., Holck, A.L. 2004. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress inducers. *J Appl Microbiol* 96:201–208.

Lasa, I., Del Pozo, J.L., Penadés, J.R., Leiva, J. 2005. Bacterial biofilms and infection. *An Sist Sanit Navar* 28:163–175.

Lavilla, L., Benomar, N., Gálvez, A., Abriouel, H. 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int J Food Microbiol* 161:97–106.

Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Casado Muñoz, M.C., Gálvez, A., Abriouel, H. 2015. Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food Microbiol* 51:33–44.

Lee, K.W., Everts, H., Kappert, H.J., Frehner, M., Losa, R., Beynen, A.C. 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Brit Poultry Sci* 44:450-457.

Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Tech* 15:67–78.

Levings, R.S., Lightfoot, D., Partidge, S.R., Hall, R.M., Djordjevic, S.P. 2005. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *J Bacteriol* 187:4401–4409.

Lewinson, O., Bibi, E. 2001. Evidence for Simultaneous Binding of Dissimilar Substrates by the *Escherichia coli* Multidrug Transporter MdfA. *Biochem* 40:12612–12618.

Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168.

Livesey, C.T., Sharpe, R.T., Hogg, R.A. 2004. Recent association of cattle botulism with poultry litter. *Vet Rec* 154:734–735.

Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., Stanton, T.B. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109:1691–1696.

López Aguayo, M.C., Grande Burgos, M.J., Lucas López, R., Gálvez, A. 2010. Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental 23:121–136.

Luecke, R.W., Thorp, F.Jr., Newland, H.W., McMillen, W.N. 1951. The growth promoting effects of various antibiotics on pigs. J Animal Sci 10:538–542.

Luo, Y., Xu, L., Rysz, M., Wang, Y., Zhang, H., Alvarez, P.J.J. 2011. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China. Environ Sci Technol 45:1827–1833.

M.A.A.M. 2011. El Consumo Alimentario en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación Medioambiente, Gobierno de España.

Mah, T.F., O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiol 9:34–39.

Mallet, A., Gueguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboue, A., Desmases, N. 2012. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. Int Dairy J 27:13–21.

Mangalappalli Illathu, A.K., Korber, D.R. 2006. Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. Antimicrob Agents Chemother 50:3588–3596.

Manijeh, M., Mohammad, J., Kermanshahi-Roha, K. 2008. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. J Biol Sci 8:502–505.

Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupré, I., Sechi, L.A. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. Int J Food Microbiol 88:291–304.

Marín Garrido, A., Grande Burgos, M.J., Fernández Márquez, M.L., López Aguayo, M.C., Pérez Pulido, R., Toledo del Árbol, J., Gálvez, A., Lucas López, R. 2015. Biocide tolerance in *Salmonella* from meats in Southern Spain. Braz J Microbiol 46:1177–1181.

Marshall, B.M., Levy, S.B. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clin Microbiol Rev 24:718–733.

Martinez, J.L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157:2893–2902.

Martinez, J.L. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front Microbiol* 3:e1.

Mathur, S., Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int J Food Microbiol* 105:281–295.

McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S. 1998. Over-expression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 166:305–309.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–625.

Mellata, M. 2013. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. *Foodborne Pathog Dis* 10:916–932.

Mezhoud, H., Chantziaras, I., Iguer-Ouada, M., Moula, N., Garmyn, A., Martel, A., Boyen, F. 2016. Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian Pathol* 24:1–30.

Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J. 2006. Raw milk microbial composition: differences in links with microbial practices. *Rencontres Rech Rumin* 13:309–312.

Middleton, J.H., Salierno, J.D. 2013. Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA). *Ecotox Environ Safe* 88:79–88.

Mitchell, N.M., Johnson, J.R., Johnston, B., Curtiss, R., Mellata, M. 2015. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol* 81:1177–1187.

Moats, W.A. 1981. Factors affecting bacterial loads on shells of commercially washed eggs. *Poultry Sci* 60:2084–2090.

Moken, M.C., McMurry, L.M., Levy, S.B. 1997. Selection of multiple antibiotic resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2770–2772.

Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., Montel, M.C. 2012. Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Sci Technol* 92:265–278.

Moore, P.R., Evenson, H., Luckey, T.D., McCoy, E., Eluehjem, C.A., Hart, E. B. 1946. Use of Sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J Biol Chem* 165:437–441.

Moretro, T., Heir, E., Nesse, L.L., Vestby, L.K., Langsrud, S. 2012. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Res Int* 45:532–544.

Morrissey, I., Oggioni, M.R., Knight, D., Curiao, T., Coque, T., Kalkanci, A., Martinez, J.L. 2014. The BIOHYPO Consortium. Evaluation of Epidemiological Cut-Off Values Indicates that Biocide Resistant Subpopulations Are Uncommon in Natural Isolates of Clinically-Relevant Microorganisms. *PLoS ONE* 9:86669.

Mudambi, S.R. 2007. Eggs. *Food Sci* 2:115–120.

Mulvey, M.R., Boyd, D., Olson, A.B., Doublet, B., Cloeckaert, A. 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microb Infect* 8:1915–1922.

Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T. 2007. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol Res* 162:115–123.

Murtough, S.M., Hiom, S.J., Palmer, M., Russell, A.D. 2001. Biocide rotation in the healthcare setting: Is there a case for policy implementation? *J Hosp Infect* 48:1–6.

Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K. 2004. Identification of *Enterobacteriaceae* from washed and unwashed commercial shell eggs. *J Food Prot* 67:2613–2616.

Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K., Curtis, P.A., Anderson, K.E., Fletcher, D.L., Cox, N.A. 2004. Survey of shell egg processing plant sanitation programs: effects on non-egg-contact surfaces. *J Food Prot* 67:2801–2804.

Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K., Harrison, M.A., Cox, N.A. 2005. Impact of commercial processing on the microbiology of shell eggs. *J Food Prot* 68:2367–2375.

Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K., Cox, N.A., Harrison, M.A., Fedorka-Cray, P.J., Ladely, S.R. 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. *Poult Sci* 85:1665–1669.

Musgrove, M.T., Northcutt, J.K., Jones, D.R., Cox, N.A., Harrison, M.A. 2008. *Enterobacteriaceae* and related organisms isolated from shell eggs collected during commercial processing. *Poult Sci* 87:1211–1218.

Musgrove, M.T., Jones, D.R., Shaw, J.D., Sheppard, M., Harrison, M.A. 2009. *Enterobacteriaceae* and related organisms isolated from nest run cart shelves in commercial shell egg processing facilities. *Poultry Sci* 88:2113–2117.

Nataro, J.P., Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142–201.

Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 26:643.

Olsen, S.J., Ying, M., Davis, M.F., Deasy, M., Holland, B., Lampietro, L., Baysinger, M., Sassano, F., Polk, L., GormLey, B., Hung, M., Pilot, K., Orsini, M., Van duyne, S., Rankin, S., Genese, C., Bresnitz, E. 2004. Multidrugresistant *Salmonella typhimorium* Infection from milk contaminated after pasteurization. *Emer Infect Dis* 10: 932–935.

Ortega, R.M. 2003. El huevo en la alimentación. Importancia nutricional y sanitaria. Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande-Burgos, M.J., Abriouel, H., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A. 2013. Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol* 162:13–25.

Osman, K.M., Zolnikov, T.R., Samir, A., Orabi, A. 2014. Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. *Pathog Glob Health* 108:21–29.

O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49–79.

Ott, W.H. 1956. Penicillin in feed. US Patent No. 2753266 A.

Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: Al-Amoodi, L. (ed.). *Silage Science and Technology*. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. p. 31–93.

Pande, V.V., Gole, V.C., McWhorter, A.R., Abraham, S., Chousalkar, K.K. 2015. Antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolates from egg layer flocks and egg shells. *Int J Food Microbiol* 16:23–26.

Parish, M.E., Narcisco, J.A., Friedrich, L.M. 1997. Survival of *Salmonella* in orange juice. *J Food Saf* 61:280–284.

Park, E.J., Oh, S.W., Kang, D.H. 2008. Fate of *Salmonella tennessee* in peanut butter at 4 and 22°C. *J Food Prot* 73:M82–M86.

Patel, R. 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* 437:41–47.

Pedroso, A.F., Adesogan, A.T., Queiroz, O.C.M., Williams, S.K. 2010. Control of *Escherichia coli* O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: efficacy and mode of action. *J Dairy Sci* 93:1098–1104.

Peláez, C., Requena, T. 2005 Exploring the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int Dairy J* 15:831–844.

Peques, D.A., Miller, S.I. 2009. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (7th ed). Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone

Perez-Moreno, M.O., Picó-Plana, E., de Toro, M., Grande-Armas, J., Quiles-Fortuny, V., Pons, M.J. 2013. β -lactamases, transferable quinolone resistance determinants, and class 1 integron-mediated antimicrobial resistance in human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes. *Int J Med Microbiol* 303:25–31.

Pernak, J., Mirska, I., Kmiecik, R. 1999. Antimicrobial activities of new analogues of benzalkonium chloride. *Eur J Medicin Chem* 34:765–771.

Pfizer. 1954. Improvements in or relating to animal feed compositions. UK Patent No. 709348 A.

Pfizer. 1970. Animal feed composition. UK Patent No. 1180143 A.

Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Mylly, V., Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci* 87:2433–2441.

Ploy, M.C., Courvalin, P., Lambert, T. 1998. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a Class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2557–2563.

Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E.B., Labia, R., Nordmann, P. 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 43:573–581.

Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 622– 632.

Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M.G., Nordmann, P. 2001. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2598–2603.

Poole, K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol Symposium Supplement* 92:55S–64S.

Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 10:12–26.

Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrobial Chemother* 56: 20–51.

Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals Med* 39:162–176.

Poppe, C., McFadden, K.A., Demczuk, W.H.B. 1996. Drug resistance, plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. *Int J Food Microbiol* 30:325–344.

Porrero, M., García, M., Cubillo, I., Rivero, E., Herrera, L., Mariano, E. 2006. *Salmonelosis*. *Salmonelosis y Huevos*. Madrid, pp. 28–32.

Potenski, C.J., Gandhi, M., Matthews, K.R. 2003. Exposure of *Salmonella* Enteritidis to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 220:181–186.

Prats, G., Coll, P. 1998. Géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia*. In J.A. García Rodríguez, J.J. Picazo, *Microbiología Médica*. Madrid: Harcourt Brace, pp. 246–249.

Pruden, A. 2013. Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance. *Environ Sci Technol* 48:5–14.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese *Int J Food Microbiol* 150:81–94.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. 2013. The microbial content of raw and pasteurised cow's milk as determined by molecular approaches. *J Dairy Sci* 96:1–10.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37:664–698.

Raats, D., Offek, M., Minz, D., Halpern, M. 2011. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiol* 28:465–471.

Randall, L.P., Woodward, M.J. 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci* 72:87–93.

Randall, L.P., Clouting, C.S., Gradel, K.O., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.D., Woodward, M.J. 2005. Farm disinfectants select for cyclohexane resistance, a marker of multiple antibiotic resistance, in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 98:556–563.

Ranieri, M.L., Huck, J.R., Sonnen, M., Barbano, D.M., Boor, K.J. 2009. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci* 92:4823–4832.

Raun, A. 1974. Antibiotics monensin and a204 for improving ruminant feed efficiency. US Patent No. 3839557.

Raza, A., Sarwar, Y., Ali, A., Jamil, A., Haque, A., Haque, A. 2011. Effect of biofilm formation on the excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhi in feces. *Int J Infect Dis* 15:747–752.

Reglamento (CE). 2008. Reglamento (CE) No.589. Diario Oficial de la Unión Europea.

Rhone, P. 1961. Compositions for the nutrition of animals. UK Patent No. 871285 A.

Ricke, S.C., Birkhold, S.G., Gast, R.K. 2001. Eggs and egg products. In: Downes FP, Ito K. editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Assoc. Washington, D.C. pp. 473–479.

Riva, A., Borghi, E., Cirasola, D., Colmegna, S., Borgo, F., Amato, E., Pontello, M.M., Morace, G. 2015. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Milk: Prevalence, SCCmec Typing, Enterotoxin Characterization, and Antimicrobial Resistance Patterns. *J Food Prot* 78:1142–1146.

Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heur, O.E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J.M., Segovia, C., Sigauque, B., Tacconelli, E., Wellington, E., Vila, J. 2015. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbe and New Infect* 6:22–29.

Rodney, M.D. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881–890.

Rodrigues, D., Cerca, N., Teixeira, P., Oliveira, R., Ceri, H., Azeredo, J. 2011. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. *Microbial Drug Resist* 17:181–189.

Rodrigues, D., Teixeira, P., Oliveira, R., Azeredo, J. 2011. *Salmonella enterica* Enteritidis biofilm formation and viability on regular and triclosan impregnated bench cover materials. *J Food Prot* 74:32–37.

Rodríguez, R.V.M., Magro, E.S. 2008. Bases de la Alimentación Humana. Oleiros (La Coruña), España, Editorial Netbiblo.

Rosin, M., Welk, A., Bernhardt, O., Ruhnau, M., Pitten, F.A., Kocher, T., Kramer, A. 2001. Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. *J Clin Periodont* 28:1121–1126.

Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 292:115–125.

Ruíz López, M.D. 2010. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad nutritiva de los Alimentos. Ángel Gil Hernández; coordinador, María Dolores Ruiz López. Editorial Médica Panamericana. 2ª edición. 2010.

Russel, A.D. 1995. Mechanism of Bacteria Resistance to Biocides. *Int Biodet Biodeg* 36:247–265.

Russel, A.D., McDonnell, G. 2000. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *J Hosp Infect* 44:1–3.

Russel, A.D. 2003. Biocide usage and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 3:794–803.

Russel, A.D. 2004. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, desinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect* 57:97–104.

Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 18:353–358.

Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., Guerry, P. 1993. Enterococcal *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 90:3093–3097.

Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. J Appl Microbiol 101:542–555.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. pp:24–25.

Seeger, M.A., Diederichs, K., Eicher, T., Brandstätter, L., Schiefner, A., Verrey, F., Pos, K.M. 2008. The AcrB efflux pump: conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance. Curr Drug Targ 9:729–749.

Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., Yuk, H.G. 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. Crit Rev Food Sci Nutr 54:625–644.

Shakēd, T., Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M. 2009. *Epilithonimonas lactis* sp. nov., isolated from raw cow milk. Int J Syst Evol Microbiol 60:675–679.

Sidhu, M.S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., Holck, A. 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with b-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 46:2797–2803.

Silva, R., Cruz, A., Faria, J., Moura, M., Carvalho, M., Water, E., Hand, A. 2010. Pasteurized milk: efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. Foodborne Pathog Dis 7:217–219.

Singh, R., Schroeder, C.M., Meng, J., White, D.G., McDermott, P.F., Wagner, D.D., Yang, H., Simjee, S., DebRoy, C., Walker, R.D., Zhao, S. 2005. Identification of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from humans and food animals. J Antimicrob Chemother 56:216–219.

Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., Haesebrouck, F., Butaye, P. 2010. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. FEMS Microbiol Rev 34:295–316.

Smith, H.W. 1970. Effect of antibiotics on bacterial ecology in animals. Am J Clin Nutr 23:1472–1479

Soufi, L., Sáenz, Y., de Toro, M., Abbassi, M.S., Rojo-Bezares, B., Vinué, L., Torres, C. 2012. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella enterica*

recovered from poultry meat in Tunisia and identification of new genetic traits. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12:10–16.

Soumet, C., Fourreau, E., Legrandois, P., Maris, P. 2012. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 158:147–152.

Sparks, N. 2000. Microbiology of Fresh Eggs. *Encyclopedia of Food Microbiology – Process Hygiene*, Academic.

Srilakshmi, B. 2003. *Food Science*, New Age International, 1–380.

Stanton, T.B. 2013. A call for antibiotic alternatives research. *Trends Microbiol* 21:111–113.

Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. 2011. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int* 45:502–531.

Stewart, P.S., Costerton, J.W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358:135–138.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Rev Microbiol* 56:187–209.

Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22:664–689.

Su, L.H., Chiu, C.H., Chu, C., Ou, J.T. 2004. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. *Clin Infect Dis* 39:546–551.

Svenningsen, H., Henriksen, T., Priemé, A., Johnsen, A.R. 2011. Triclosan affects the microbial community in simulated sewage-drain-field soil and slows down xenobiotic degradation. *Environ Pollut* 159:1599–1605.

Swenson, J.M., Facklam, R.R., Thornsberry, C. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 34:543–549.

Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., Chikindas, M.L., Yaron, S. 2007. Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 267:200–206.

Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.B., McDermott, P.F. 2012. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerg Infect Dis* 18:741–749.

Tasci, F., Turutoglu, H., Ogutcu, H. 2010. Investigations of *Listeria* species in milk and silage produced in Burdur province. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Kafkas* 16 (Suppl-A): S93–S97.

Tauxe, R.T. 1991. *Salmonella*: A postmodern pathogen. *J Food Prot* 54:563–568.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol* 81:1–10.

Tenover, F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 34:S3–S10.

Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 173–234.

Thaker, H., Brahmabhatt, M., Nayak, J., Thaker, H.C. 2013. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat. *Vet World* 6:10–13.

Thorrold, C.A., Letsoalo, M.E., Dusé, A.G., Marais, E. 2007. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *Int J Food Microbiol* 113:315–320.

Tiihonen, K., Kettunen, H., Bento, M.H., Saarinen, M., Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Rautonen, N. 2010. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *Brit Poultry* 51:381–392.

To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W. 2002. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 68:5258–5264.

Todd, E.C.D. 1996. Worldwide surveillance of foodborne disease: The need to improve. *J Food Prot* 59:82–92.

Ueda, S., Kuwabara, Y. 2007. Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to detergents and sanitizers. *Biocont Sci* 12:149–153.

Upadhyaya, I., Upadhyay, A., Kollanoor-Johny, A., Baskaran, S.A., Mooyottu, S., Darre, M.J., Venkitanarayanan, K. 2013. Rapid inactivation of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs by plant-derived antimicrobials. *Poult Sci* 92:3228-3235.

Upadhyaya, I., Yin, H.B., Nair, M.S., Chen, C.H., Lang, R., Darre, M.J., Venkitanarayanan, K. 2016. Inactivation of *Salmonella enteritidis* on shell eggs by coating with phytochemicals. *Poult Sci* 95:2106-2111.

USDA. 2008. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Nutrient Data Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

Vacheyrou, M., Normand, A.C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., Bouton, Y. 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int J Food Microbiol* 146:253–262.

Vaclavik, V., Christian, E.W. 2007. *Essentials of Food Science*, 3rd ed. Springer Science NY, NY.

Van den Bogaard, A., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E. 1997. *Prog. Abstr. 37th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* abstr. C-137, Toronto.

Van Hoek, A., Margolles, A., Domig, K.J., Korhonen, J.M., Życka-Krzyszewska, J., Bardowski, J.K., Danielsen, M., Huys, G., Morelli, L., Aarts, H.J.M. 2008. Molecular assessment of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria and bifidobacteria and their relation to the phenotypic resistance. *Int J Probiot Prebiot* 3:271–280.

Veldman, K., Cavaco, L.M., Mevius, D., Battisti, A., Franco, A., Botteldoorn, N., Bruneau, M., Perrin-Guyomard, A., Cerny, T., De Frutos Escobar, C., Guerra, B., Schroeter, A., Gutierrez, M., Hopkins, K., Myllyniemi, A.L., Sunde, M., Wasyl, D., Aarestrup, F.M. 2011. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother* 66:1278–1286.

Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuola, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J. L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 29:177–198.

Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., Montel, M.C. 2012. Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. *Appl Environ Microbiol* 78:326–333.

Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories *BMC Vet Res* 5:20.

Vitt, A., Sofrata, A., Slizen, V., Sugars, R.V., Gustafsson, A., Gudkova, E.I., Kazeko, L.A., Ramberg, P., Buhlin, K. 2015. Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate in comparison to chlorhexidine using the quantitative suspension method. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14:36.

Vollmer, G., Josst, G., Schenker, D., Sturm, N., Vreden, N. 1999. Huevos, leche y quesos. *Elementos de Bromatología descriptiva*. Zaragoza: Acribia, S.A.

Vourli, S., Tzouvelekis, L.S., Tzelepi, E., Lebessi, E., Legakis, N.J., Miriagou, V. 2003. Characterization of In111, a class 1 integron that carries the extended-spectrum beta-lactamase gene bla_{IBC-1}. *FEMS Microbiol Lett* 225:149–153.

Wagner, R.D., Johnson, S.J., Cerniglia, C.E., Erickson, B.D. 2011. Bovine intestinal bacteria inactivate and degrade ceftiofur and ceftriaxone with multiple β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4990–4998.

Wales, A.D., Davies, R.H. 2015. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics* 4:567–604.

Walther, C., Rossano, A., Thomann, A., Perreten, V. 2008. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: presence of a mutated multidrug transporter *mdt(A)* gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. *Vet Microbiol* 131:348–357.

Wang, C.F., Tian, Y. 2015. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environ. Pollut* 206:195–201.

Watson, R.R. 2008. *Eggs and Health Promotion*, John Wiley & Sons. 1–185.

Webber, M.A., Piddock, L.J.V. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 51:9–11.

Wellington, E.M., Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M., Williams, A.P. 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis* 13:155–165.

White, D.G., Hudson, C., Maurer, J.J., Ayers, S., Zhao, S., Lee, M.D., Sherwood, J. 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J Clin Microbiol* 38:4593–4598.

White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D. 2001. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2658–2661.

Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860–864.

WHO, 2011. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. World Health Organization (WHO). http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf.

Widyastuti, Y., Febrisiantosa, R.I. 2014. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food Nut Sci* 5:435–442.

Wiedenbeck, J., Cohan, F.M. 2011. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol Rev* 35:957–976.

Williams, J., Worley, S. 2000. Types of biocides. *Encyclopedia of Food Microbiology – Process Hygiene*, Academic.

Woerther, P.L., Burdet, C., Chachaty, E., Andremont, A. 2013. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* 26:744–758.

Wong, M.H., Chen, S. 2013. First detection of *oqxAB* in *Salmonella* spp. isolated from food. *Antimicrob Agents Chemother* 57:658–660.

Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Molin, S., Givskov, M., Høiby, N. 2004. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 53:1054–1061.

Xia, K., Hundal, L.S., Kumar, K., Armbrust, K., Cox, A.E., Granato, T.C. 2010. Triclocarban, triclosan, polybrominated diphenyl ethers, and 4-nonylphenol in biosolids and in soil receiving 33-year biosolids application. *Environ Toxicol Chem* 29:597–605.

Xiong, H., Li, Y., Slavik, M.F., Walker, J.T. 1998. Spraying chicken skin with selected chemicals to reduce attached *Salmonella typhimurium*. *J Food Prot* 61:72–275.

Yang, Z., Li, Y., Slavik, M.F. 1998. Use of antimicrobial spray applied with an inside-outside bird washer to reduce bacterial contamination of prechilled chicken carcasses. *J Food Prot* 61:829–832.

Yatsuyanagi, J., Saito, S., Sato, H., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K. 2002. Characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J Clin Microbiol* 40:294–297.

Yatsuyanagi, J., Saito, S., Miyajima, Y., Amano, K., Enomoto, K. 2003. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *J Clin Microbiol* 41:2033–2039.

Yazdankhah, S.P., Scheie, A.A., Høiby, E.A., Lunestad, B.T., Heir, E., Fotland, T.O., Naterstad, K., Kruse, H. 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. *Microb Drug Resist* 12:83–90.

Yueh, M.F., Taniguchi, K., Chen, S., Evans, R.M., Hammock, B.D., Karin, M., Tukey, R.H. 2014. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. *Proc Nat Acad Sci U S A* 111:17200–17205.

Zhang, A., He, X., Meng, Y., Guo, L., Long, M., Yu, H., Li, B., Fan, L., Liu, S., Wang, H., Zou, L. 2015. Antibiotic and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from retail meats in Sichuan, China. *Microb Drug Resist* 22:80–87.

Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L. 2009. Erythromycin- and tetracycline resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages. *J Appl Microbiol* 107:1559–1568.

Zou, L., Meng, J., McDermott, P.F., Wang, F., Yang, Q., Cao, G., Hoffmann, M., Zhao, S. 2014. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. J Antimicrob Chemother 69:2644–2649.