



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Estudio de la calidad y presencia de bacterias resistentes a  
antibióticos en carnes de consumo de comercios de  
Valencia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Enguídanos García, Marta

Tutor/a: Montes Estellés, Rosa M<sup>a</sup>

Cotutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

## RESUMEN

### ESTUDIO DE LA CALIDAD Y PRESENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN CARNES DE CONSUMO DE COMERCIOS DE VALENCIA.

La resistencia a los antimicrobianos es un gran problema a nivel mundial; cada año, miles de personas mueren por enfermedades ocasionadas por bacterias multirresistentes en el mundo. Para 2050, se estima que el número de muertes podría llegar a 10 millones de personas al año, es por ello que se hace necesaria una vigilancia epidemiológica de estas resistencias. Una de las estrategias para abordar esta problemática es el enfoque global de *One Health* que se ha adoptado en los últimos años.

Los microorganismos han desarrollado una gran variedad de mecanismos para evitar la acción de los antibióticos, lo que limita la eficacia de los tratamientos y aumenta el riesgo de infecciones, suponiendo un riesgo de Salud Pública.

En el presente estudio se han analizado muestras de carne de cerdo y pollo con la finalidad de detectar resistencias a antimicrobianos betalactámicos y carbapenemes. Así mismos se ha estudiado la calidad de estas y se ha analizado la presencia de patógenos como *Salmonella* spp. utilizando la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017. En 4 de las 30 muestras analizadas presentaron alguna cepa de *Salmonella* spp. Otro potencial patógeno aislado fue *E. coli*, encontrándose en 11 de las 30 muestras analizadas.

En cuanto a las resistencias fenotípicas se analizaron por separado las presentes en el pollo y en el cerdo. En ambos tipos de carne la resistencia a la Amoxicilina fue la más destacable, con un valor de 94,4% y 84,6% respectivamente, seguida del Ácido Nalidíxico en el cerdo con un 44,4% y de la Ampicilina en el pollo, con un 84,6%. Se encontraron 7 cepas multirresistentes, correspondientes a las bacterias *E. coli* (2), *Serratia odorifera* (3), *Serratia fonticola* y *Enterobacter cloacae*.

Es esencial abordar el problema de las resistencias antibióticas desde una perspectiva amplia y coordinada, y una solución es la aplicación de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Aquellos ODS relacionados con la resistencia antimicrobiana son el fin de la pobreza, hambre cero, salud y bienestar, agua limpia y saneamiento, trabajo decente y crecimiento económico, producción y consumo responsables, y por último, alianzas para lograr objetivos.

**Palabras clave:** antibiótico, betalactámicos, carbapenemes, calidad, carne, patógeno, resistencia, y objetivos de desarrollo sostenible.

**ABSTRACT****STUDY OF THE QUALITY AND PRESENCE OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA IN CONSUMER MEATS FROM SHOPS IN VALENCIA.**

Antimicrobial resistance is a major global problem; every year, thousands of people die from diseases caused by multidrug-resistant bacteria worldwide. By 2050, it is estimated that the number of deaths could reach 10 million people per year, which is why epidemiological surveillance of antimicrobial resistance is needed. One of the strategies to address this problem is the One Health global approach that has been adopted in recent years.

Microorganisms have developed a wide variety of mechanisms to avoid the action of antibiotics, which limits the efficacy of treatments and increases the risk of infections, posing a public health risk.

In this work, the study of the food chain has been considered as part of this surveillance, specifically in consumer meats in which there are several routes of direct and indirect contact between resistant bacteria found in animals and the human population, which represents a threat to health.

In this study, samples of pork and chicken meat are analysed to detect resistance to beta-lactam antimicrobials and carbapenems. The quality of the samples was also studied and the presence of pathogens such as *Salmonella* spp. was analysed using the UNE-EN ISO 6579-1:2017 standard. 4 of the 30 samples analysed had some strain of *Salmonella* spp. Another pathogen isolated was *E. coli*, which was found in 11 of 30 samples analysed.

As for phenotypic resistances, those present in chicken and pork were analyzed separately. In both types of meat, resistance to Amoxicillin was the most outstanding, with a value of 94.4% and 84.6% respectively, followed by Nalidixic Acid in pork with 44.4% and Ampicillin in chicken, with 84.6%. Seven multiresistant strains were found, corresponding to *E. coli* (2), *Serratia odorifera* (3), *Serratia fonticola* and *Enterobacter cloacae*.

It is essential to address the antibiotic resistance problem from a comprehensive and coordinated perspective, and one solution is the implementation of the Sustainable Development Goals (SDGs). Those SDGs related to antimicrobial resistance are the end of poverty, zero hunger, health and well-being, clean water and sanitation, decent work and economic growth, responsible production and consumption, and finally, partnerships to achieve goals.

**Keywords:** antibiotic, beta-lactams, carbapenems, pathogen, quality, meat, resistance and Sustainable Development Goals.

## RESUM

### ESTUDI DE LA QUALITAT I PRESENCIA DE BACTERIS RESISTENTS A ANTIBIÒTICS EN CARNS DE CONSUM DE COMERÇOS DE VALÈNCIA.

La resistència als antimicrobians és un gran problema a nivell mundial; cada any, milers de persones moren per malalties ocasionades per bacteris multiresistents en el món. Per a 2050, s'estima que el nombre de morts podria arribar a 10 milions de persones a l'any, és per això que es fa necessària una vigilància epidemiològica d'aquestes resistències. Una de les estratègies per a abordar aquesta problemàtica és l'enfocament global de One Health que s'ha adoptat en els últims anys.

Els microorganismes han desenvolupat una gran varietat de mecanismes per a evitar l'acció dels antibiòtics, la qual cosa limita l'eficàcia dels tractaments i augmenta el risc d'infeccions, suposant un risc de Salut Pública.

En el present estudi s'han analitzat mostres de carn de porc i pollastre amb la finalitat de detectar resistències a antimicrobians betalactàmicos i carbapenemes. Així mateix s'ha estudiat la qualitat d'aquestes i s'ha analitzat la presència de patògens com a *Salmonella* spp. utilitzant la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017. En 4 de les 30 mostres analitzades van presentar algun cep de *Salmonella* spp. Un altre potencial patògen aïllat va ser *E. coli*, trobant-se en 11 de les 30 mostres analitzades.

Quant a les resistències fenotípiques es van analitzar per separat les presents en el pollastre i en el porc. En tots dos tipus de carn la resistència a la Amoxicilina va ser la més destacable, amb un valor de 94,4% i 84,6% respectivament, seguida de l'Àcid Nalidíxico en el porc amb un 44,4% i de l'Ampicil·lina en el pollastre, amb un 84,6%. Es van trobar 7 ceps multiresistents, corresponents als bacteris *E. coli* (2), *Serratia odorifera* (3), *Serratia fonticola* i *Enterobacter cloacae*.

És essencial abordar el problema de les resistències antibiòtiques des d'una perspectiva àmplia i coordinada, i una solució és l'aplicació dels Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS). Aquells ODS relacionats amb la resistència antimicrobiana són la fi de la pobresa, fam zero, salut i benestar, aigua neta i sanejament, treball decent i creixement econòmic, producció i consum responsables, i finalment, aliances per a aconseguir objectius.

**Paraules clau:** antibiòtic, betalactàmicos, carbapenemes, qualitat, carn, patògen, resistència, i objectius de desenvolupament sostenible.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Importancia del sector cárnico en España.</b> .....	1
<b>1.2. Antibióticos betalactámicos y carbapenemes.</b> .....	1
<b>1.3. Resistencia antimicrobiana.</b> .....	3
<b>1.4. Resistencias antibióticas de enterobacterias, <i>E. coli</i> y <i>Salmonella spp.</i></b> .....	4
1.4.1. Resistencias microbianas en enterobacterias. ....	4
1.4.2. Resistencias antibióticas en <i>E. coli</i> . ....	6
1.4.3. Resistencias microbianas en <i>Salmonella spp.</i> .....	6
<b>1.5. Iniciativa “One Health” y microorganismos críticos.</b> .....	8
<b>1.6. Objetivos de desarrollo sostenible.</b> .....	9
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
<b>3.1. Origen y preparación de las muestras.</b> .....	12
<b>3.2. Análisis de la calidad de las muestras.</b> .....	13
<b>3.3. Estudio de la presencia de <i>Salmonella spp.</i></b> .....	13
<b>3.4. Identificación y aislamiento de aislados.</b> .....	14
3.4.1. Pruebas previas para la identificación .....	14
3.4.2. Tinciones Gram .....	15
3.4.3. Tiras API 20E .....	15
<b>3.5. Estudio de las resistencias antibióticas</b> .....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b> .....	17
<b>4.1. Calidad higiénico-sanitaria</b> .....	17
4.1.1. Recuento y aislamiento de <i>E. coli</i> . ....	17
4.1.2. Detección y aislamiento de <i>Salmonella spp.</i> .....	18
<b>4.2. Aislamiento de cepas para el estudio de resistencias antibióticas</b> .....	20
4.2.1. Cepas de enterobacterias aislada del medio MacConkey suplementado con antibióticos. ....	20
4.2.2. Aislados de enterobacterias del medio Cromógeno de Coliformes. ....	21
4.2.3. Aislados procedentes del medio Cromógeno de <i>Salmonella spp.</i> .....	23
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	29
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	30

**LISTADO DE TABLAS**

Tabla 1: Muestras analizadas, procedencia, fecha y tipo. ....	12
Tabla 3: Recuento y detección de <i>E. coli</i> por número de muestra, tipo de muestra y comercio. ....	17
Tabla 4: número de muestra, tipo de muestra, comercios y detección de <i>Salmonella</i> spp. ....	19
Tabla 5: identificación de las cepas procedentes de medios MacConkey suplementados con antibióticos mediante tiras API 20E. ....	20
Tabla 6: identificación de las cepas procedentes del medio CC mediante tiras API 20E.22	
Tabla 7: identificación de las cepas procedentes de medios XLD, CS y mediante tiras API 20 E. ....	23
Tabla 8: patrones de resistencia encontrados en el estudio. ....	24

**LISTADO DE GRÁFICOS**

Gráfico 1: antibióticos resistentes, intermedios y sensibles encontrados en los aislados procedentes de muestras de cerdo. ....	26
Gráfico 2: antibióticos resistentes, intermedios y sensibles encontrados en los aislados procedentes de muestras de pollo. ....	27

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Importancia del sector cárnico en España.**

La industria cárnica española hoy en día es la más relevante, ocupando casi el 30% de todo el sector alimentario y facturando más de 31 millones de euros al año. En España hay alrededor de unas 2800 empresas destinadas a la producción de carne apta para consumo humano (ANICE, 2022).

En el año 2021, la industria de la carne de porcino alcanzó la cifra récord de 5,17 millones de toneladas. Esto posiciona a este sector como el tercer mayor productor a nivel mundial, siendo el principal productor de carne de porcino en Europa (ANICE, 2022).

España se posiciona como el segundo mayor productor europeo de carne de pollo, con el 11,8% de la producción total y solo es superada por Reino Unido. La producción avícola ha evolucionado hasta alcanzar una estabilización cercana al millón de toneladas, con un leve déficit de abastecimiento que se cubre mediante importaciones de otros países. En España, la producción de carne de pollo se sitúa principalmente en Cataluña con casi un 30%, seguida por la Comunidad Valenciana con un 17%. Además, es el tipo de carne más consumida, seguida del cerdo (MAPA, 2022).

Por otro lado, el sector del vacuno experimentó un aumento en su producción, alcanzando las 714.000 toneladas, lo que representa un crecimiento del 5,4% en comparación con el año 2020. En cuanto al sector ovino y caprino, se registró un leve crecimiento del 1%, alcanzando las 126.000 toneladas. A pesar de este ligero aumento, España se ha convertido en el principal productor europeo, con un 27,1% del total. En lo que respecta a la producción de elaborados cárnicos, España ocupa el cuarto lugar dentro de la Unión Europea, con una producción anual de más de 1,4 millones de toneladas (Depares, 2022).

En cuanto a la carne consumida en España, cada persona de media ingiere alrededor de 50 kilos de carne al año. Este dato es preocupante porque la recomendación de la OMS se sitúa en 21 kilos de carne por persona al año. En los últimos años ha aumentado el consumo de carne debido a la pandemia y se ha producido en todas las zonas de España por igual (Vásquez, 2022). La relación entre la industria cárnica y los antibióticos se debe de tener en cuenta por los riesgos asociados con el desarrollo de resistencia bacteriana, la transferencia de bacterias resistentes a los humanos, y el impacto en la salud pública y el medio ambiente. Es fundamental promover prácticas responsables en el uso de antibióticos en la producción animal, así como fomentar medidas de control y vigilancia para mitigar el riesgo (ANICE, 2022).

### **1.2. Antibióticos betalactámicos y carbapenemes.**

Los antibióticos son sustancias químicas que presentan distintas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que actúan específicamente en nuestro cuerpo. El primer antibiótico que se implementó fue el salvarsán en 1910, pero el descubrimiento de la penicilina marcó el inicio del descubrimiento de muchos antibióticos de origen natural, alcanzando su punto máximo en la década de los 50. Sin embargo, a partir de este punto, ha

habido una disminución progresiva en el hallazgo y desarrollo de nuevos antibióticos. Además, la evolución de la resistencia a los medicamentos en muchos patógenos que afectan a los seres humanos ha dado lugar a la actual problemática de resistencia antimicrobiana (Hutchings *et al.*, 2019).

Los antibióticos betalactámicos, como su nombre indica, están formados por un anillo  $\beta$ -lactámico que es heterocíclico y lo componen tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. Su función farmacocinética, antimicrobiana y toxicidad depende de las propiedades de los radicales, destacando las cadenas laterales complementarias que son las que más influyen (Gómez *et al.*, 2015).

Estos antibióticos actúan mediante dos tipos de mecanismos: inhibiendo la síntesis de las paredes bacterianas y produciendo la autólisis de las bacterias. Las paredes bacterianas están por encima de la membrana citoplasmática y están compuestas de un copolímero. En las bacterias gramnegativas la pared celular se ve delgada y su membrana interna presenta menos peptidoglucano que las grampositivas, además de que la capa externa presenta proteínas y lípidos (Suárez y Gudiol, 2009).

Los antibióticos beta lactámicos tienen una capacidad bactericida muy rápida y son muy tolerantes, muy pocas personas son alérgicas a ellos. Además, apenas presentan toxicidad, por lo que son unos de los antibióticos más utilizados (Gómez *et al.*, 2015).

Dentro del grupo de los antibióticos betalactámicos encontramos distintas moléculas, empezando por la penicilina, probablemente el fármaco más conocido de todo el mundo. Existen varios tipos de penicilina: las naturales, semisintéticas y las inhibidoras de betalactamasas (Gómez *et al.*, 2015).

La penicilina G es la más importante de las penicilinas naturales, y esta se usa normalmente contra bacterias que son grampositivas y contra cocos gramnegativos, pero no todos. Se usa especialmente en tratamientos como la sífilis o infecciones por clostridios. Por otro lado, la amoxicilina y la ampicilina son los fármacos más representativos de las penicilinas semisintéticas, y actúan contra enterococos y algunos bacilos gramnegativos como *E. coli* o *Salmonella* spp. En concreto, la ampicilina es empleada para tratar infecciones por bacterias gramnegativas, como infecciones de orina, y otras como la sepsis biliar. Sin embargo, otras penicilinas como la piperacilina y el tazobactam no inhiben con fiabilidad las betalactamasas de espectro extendido, los carbapenemes, y las AmpC betalactamasas; éstas últimas producidas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella* spp, *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia* spp y *Enterobacter* (Werth, 2023).

Las cefalosporinas son otra clase de betalactámicos que provienen del ácido 7-aminocefalosporánico, que no se produce de forma natural y se ha modificado y ha dado lugar hasta cinco generaciones diferentes de cefalosporinas. Su forma de actuar es inhibiendo la síntesis de las paredes bacterianas, y se usan para tratar infecciones causadas por patógenos tanto gramnegativos como positivos. Las cefalosporinas de primera generación son más

eficaces contra microorganismos grampositivos y las generaciones posteriores presentan espectro extendido frente a bacilos aerobios gramnegativos. Las cefalosporinas presentan algunas limitaciones, como la falta de actividad contra enterococos, bacilos anaerobios gramnegativos y estafilococos con resistencia a la meticilina (Werth, 2023).

También se encuentran los monobactámicos, concretamente el aztreonam, que es la única de su clase que existe. Actúan interrumpiendo la síntesis de la pared bacteriana de las bacterias gramnegativas aerobias, y en menor medida, de las grampositivas. Se utiliza en tratamientos como sustituto de los betalactámicos para los pacientes con alergias a estos últimos. La característica única del aztreonam es que tiene un núcleo de un solo ciclo (Oiseth *et al.*, 2022).

Otra clase de antibiótico betalactámico son los carbapenemes, diferenciados principalmente por poseer un átomo de carbono en la posición uno, de manera que sustituye al átomo de azufre que normalmente presentan otros betalactámicos. Su espectro bactericida es el más amplio de todas las clases de betalactámicos, pero no tienen efecto contra aquellas bacterias que se reproducen intracelularmente, *Salmonella* spp. (Monge, 2013).

Para este estudio se ha utilizado el antibiótico carbapenémico Imipenem, que es muy activo contra las enterobacterias. Actúa al igual que otros antibióticos betalactámicos, inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana (Chaudhry *et al.*, 2019). Interfiere con la formación de enlaces cruzados de peptidoglicanos en la pared celular y esto conlleva a la lisis y muerte de las bacterias. Sin embargo, el Imipenem es más resistente a las enzimas betalactamasas producidas por algunas bacterias que inactivan otros antibióticos betalactámicos, por lo que se combina con cilastatina, inhibidora de deshidropeptidasa (Salmon-Rousseau *et al.*, 2020).

### **1.3. Resistencia antimicrobiana.**

Las bacterias para asegurar su supervivencia son capaces de resistir los efectos de los biocidas y antibióticos ya sea por una propiedad natural o adquirida. Mediante la transferencia horizontal de genes se adquieren las resistencias naturales. En este proceso se generan plásmidos con genes de resistencia que aumentan la prevalencia de bacterias resistentes. El uso inadecuado de los tratamientos con antibióticos corresponde con la resistencia adquirida. (Giono-Cerezo *et al.*, 2020).

Para abordar la amenaza que representa la resistencia antibiótica, se han de comprender los factores que impulsan su desarrollo. Un factor crucial es el ciclo de replicación bacteriana, que posibilita la aparición de nuevas mutaciones. Por ejemplo, una sola bacteria de *S. aureus* puede replicarse hasta 10 generaciones en menos de 12 horas, generando aproximadamente un millón de descendientes. En cada ciclo de replicación existe la posibilidad de que aparezcan mutaciones, lo que contribuye al desarrollo de factores genéticos asociados con la resistencia antimicrobiana (Marston *et al.*, 2016).

A parte del mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos, existen otros tipos, como la acción sobre la membrana citoplasmática, inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibidores de la síntesis proteica o por acción sobre las vías metabólicas. Los antibióticos que

influyen en la membrana plasmática modifican su permeabilidad y salida de electrolitos, alterando la composición del medio intracelular y conllevando a la muerte de la bacteria. Los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos se unen a enzimas específicas involucradas en la transcripción y replicación del ADN, por lo que detienen el proceso. Los antibióticos que actúan mediante la inhibición de la síntesis proteica lo hacen selectivamente debido a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los antibióticos se unen al ribosoma e interfieren en la etapa de síntesis proteica, pudiendo inhibir el principio de la transcripción, bloquear la unión del ARNt con el ARNm o interferir en la traslocación dentro del ribosoma. Por último, muchas bacterias usan la vía metabólica de síntesis de folatos para producir purinas y que los ácidos nucleicos no puedan obtener ácido fólico del exterior, por lo que las bacterias no pueden replicarse ni crecer (Treviño y Molina, 2022).

Por otra parte, las bacterias pueden presentar simultáneamente más de un mecanismo de resistencia a los antibióticos. Esto puede dar lugar a bacterias multirresistentes, bacterias con resistencia extrema o bacterias panresistentes en antibióticos. Las bacterias multirresistentes muestran resistencia a 3 o más familias de antibióticos utilizados para tratar infecciones producidas por un microorganismo concreto; las bacterias con resistencia extrema presentan resistencia a casi todos los antibióticos, exceptuando uno o dos de las familias utilizadas y, por último, las bacterias panresistentes son las que resisten a todos los antibióticos o familias utilizadas para tratar las infecciones producidas (Becerra, 2021).

La innovación en la investigación para desarrollar nuevos antibióticos es una buena estrategia para reducir el problema de las resistencias, pero el ritmo de introducción de nuevos antibióticos ha disminuido considerablemente en comparación con décadas anteriores. Por ejemplo, desde finales de 2012 solo se han aprobado 5 nuevos antimicrobianos. Esta desaceleración también se ha observado en otro tipo de medicamentos que no son antibióticos. El escaso número de nuevos antibióticos se debe a que las fuentes tradicionales de estos productos ya han sido evaluadas exhaustivamente (Marston *et al.*, 2016).

#### **1.4. Resistencias antibióticas de enterobacterias, *E. coli* y *Salmonella* spp.**

Se han identificado microorganismos resistentes a los antibióticos, como las enterobacterias resistentes a betalactámicos o carbapenemes, que representan una amenaza para la salud global. Estas bacterias son capaces de persistir incluso en presencia de altas concentraciones de antibióticos y han causado un aumento en la mortalidad por infecciones graves (Ashbolt *et al.*, 2013). Además, el ambiente hospitalario ha demostrado ser un reservorio importante para estas bacterias resistentes, ya que existen estudios epidemiológicos que han demostrado que los hospitales albergan una gran variedad de bacterias con plásmidos resistentes a carbapenemes y que pueden transferirse a enterobacterias (ECDC, 2019).

##### **1.4.1. Resistencias microbianas en enterobacterias.**

*Acinetobacter baumannii* es un microorganismo gramnegativo y sin flagelo que ha emergido como una bacteria de gran importancia en el entorno hospitalario debido a su capacidad oportunista. Esta cepa bacteriana es responsable de una amplia gama de manifestaciones clínicas y se ha vuelto cada vez más resistente a varios grupos de antibióticos, lo que complica

el tratamiento de las infecciones causadas por ella. Aunque en la década de los setenta, las cepas de esta bacteria solían ser sensibles a la mayoría de los antibióticos disponibles, incluidos los betalactámicos, en tiempos recientes, se ha observado un preocupante aumento en la prevalencia de su multirresistencia (Vanegas *et al.*, 2014).

*Serratia odorifera* es una bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa, con forma de bacilo que tiende a colonizar los tractos tanto gastrointestinales, como respiratorios y urinarios. Este tipo de cepa raramente causa infecciones. Se suele encontrar en suelos y es capaz de emitir gran cantidad de compuestos volátiles (Kai *et al.*, 2010).

*Serratia ficaria* presenta las mismas características que la anterior bacteria, y en este caso hay estudios que afirman que el papel como patógeno de *Serratia ficaria* es cuestionable, de 385 pacientes enfermos de la vesícula biliar, solamente uno de ellos enfermó a causa de esta bacteria (Anahory *et al.*, 1998).

*Enterobacter aerogenes* es una bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa, con forma de bastón. En las últimas décadas se ha reportado como oportunista y multirresistente en humanos, sobre todo en ambientes hospitalarios. Es la causante de gran parte de las infecciones nosocomiales, además de otras, y está asociada a enfermedades causadas por *Klebsiella pneumoniae*. Además, presenta resistencia intrínseca a la Ampicilina (Davin-Regli *et al.*, 2015).

*Serratia marcescens* es un bacilo gramnegativo en ocasiones patógeno para el ser humano. Se encuentra especialmente en ambientes hospitalarios y es oportunista, afectando a las personas inmunodeprimidas mayoritariamente. En un estudio realizado, se confirmó que las infecciones que se detectaron en causadas por esta bacteria fueron debidas a una contaminación extrínseca del dispensador de jabón de la UCI (Khanna *et al.*, 2013).

*Kluyvera spp* son bacilos gramnegativos que colonizan las vías urinarias, gastrointestinales y respiratorias muy comunes en hospitales. El tratamiento que se utiliza para tratar las infecciones varía porque dependiendo de la especie, presentan unas resistencias antibióticas u otras (Santos *et al.*, 2021).

*Enterobacter cloacae* es una bacteria que se encuentra en el tracto intestinal de humanos y animales, siendo patógena también en plantas e insectos. Es un patógeno que causa infecciones nosocomiales, sobre todo en las unidades neonatales. Presenta resistencia intrínseca a la Amoxicilina y Ampicilina, además de otros antibióticos como las cefalosporinas, y el estudio de resistencia fenotípica (Davin-Regli *et al.*, 2015).

*Proteus mirabilis* es una bacteria gramnegativa que causa enfermedades en humanos asociadas con el tracto urinario y forma parte de la flora fecal normal, por lo que puede manifestarse si la flora ha sido alterada con algún tratamiento y se encuentra debilitada. Este microorganismo es incapaz de metabolizar lactosa en el agar MacConkey. Además, es resistente a la Ampicilina, tetraciclinas, cefalosporinas de primera generación, fluorquinolonas y aminoglucósidos (Bush y Vázquez-Pertejo, 2023).

*Morganella morganii* es una bacteria gramnegativa, móvil, no fermentadora de lactosa que se encuentra en el medioambiente y el aparato digestivo de los animales y humanos que causa infecciones en el tracto intestinal y urinario. Es un patógeno oportunista poco común que ha ido cobrando importancia con el tiempo y puede llegar a ser multirresistente, siendo resistente a la gran mayoría de familias de antibióticos, de forma que el tratamiento clínico fracasa muy frecuentemente y produce una elevada mortalidad (Liu *et al.*, 2016).

#### **1.4.2. Resistencias antibióticas en *E. coli*.**

Un ejemplo de microorganismo relevante para el presente trabajo con posible resistencia a los carbapenemes es *Escherichia coli*, que forma parte del microbiota intestinal en los humanos y provocan distintas infecciones en el tracto urinario, respiratorio y en la sangre. En los últimos años, el aumento de la propagación de la bacteria *Escherichia coli*, que produce enzimas betalactamasas de espectro extendido (ESBL), ha generado la necesidad de recurrir cada vez más a los antibióticos carbapenémicos. Estos son utilizados debido a su capacidad de resistir la hidrólisis provocada por las enzimas ESBL, a diferencia de la mayoría de los antibióticos betalactámicos (ECDC, 2019). Esta bacteria gramnegativa posee una gran capacidad para adquirir resistencia, ya que, al habitar en el tracto gastrointestinal, se expone directamente a los antibióticos porque muchos se administran mediante vía oral (Yassin *et al.*, 2017).

En los últimos 20 años los brotes producidos por la bacteria *E. coli* han aumentado considerablemente, no solo provocando daños en la salud, también produciendo graves pérdidas económicas. La mayoría de los brotes producidos por *E. coli* se atribuyen a alimentos poco cocidos o contaminados. Uno de los brotes más graves de *E. coli* surgió en el año 2011 en Alemania, en el que se infectaron 3816 personas con *Escherichia coli* O104:H4, una cepa poco común de esta bacteria (Yang *et al.*, 2017), y fue debido a la distribución de semillas de fenogreco procedentes de Egipto contaminadas (Blanco, 2012).

#### **1.4.3. Resistencias microbianas en *Salmonella* spp.**

Dentro de las enfermedades zoonóticas, la salmonelosis es la más extendida globalmente, ya que la interacción entre la naturaleza, animales y humanos provoca una rápida propagación. La principal preocupación es que los tratamientos antimicrobianos convencionales de la salmonelosis fracasan frecuentemente debido a que las bacterias se han hecho resistentes. La resistencia adquirida de la *Salmonella* spp. se obtiene mediante la transmisión del material genético extracromosómico de otras bacterias o mediante mutaciones del cromosoma bacteriano (Rivera *et al.*, 2012).

La avicultura es una de las áreas de producción pecuaria que ha recibido especial atención en estudios epidemiológicos. Esto se debe a que las aves son portadoras asintomáticas de los dos serotipos anteriores significativos en los seres humanos: *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. En un estudio realizado, se encontraron 39 cepas de *Salmonella* spp. en aves sanas, instalaciones, equipos, agua y alimentos. El 50% de las cepas correspondieron a *S. Infantis*, un 26.67% a *S. Enteritidis* y el resto a otros serotipos. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana mostraron

resistencia del 100% a las cefalosporinas de todas las generaciones, por lo que es un dato preocupante (Ruiz *et al.*, 2006).

Además, en otras especies animales, como algunos bovinos que presentaron síntomas de desnutrición, diarrea sanguinolenta y muerte por septicemia, se aislaron cepas de *S. Typhimurium* y resultaron ser resistentes a tetraciclinas, cefalexinas, amoxicilinas, y ácido clavulánico. Sin embargo, se observó alta sensibilidad a las quinolonas y cefalosporinas (Odrizola *et al.*, 2008).

La infección por *Salmonella* spp. puede ocurrir al consumir productos avícolas (especialmente pollo y huevos), carne, leche y vegetales contaminados desde su origen. Se ha observado que los brotes de *S. Enteritidis* (44%) están más frecuentemente asociados al consumo de huevos contaminados en comparación con otros serotipos de *Salmonella* spp. (15%). Para prevenir el aumento de las resistencias de los distintos tipos de *Salmonella* spp., una de las estrategias es limitar el uso de antimicrobianos en pacientes con gastroenteritis, haciéndolos necesarios solo en casos de bacteriemia, ya que en la mayoría de los casos los pacientes pueden recuperarse del patógeno en unos pocos días sin necesidad de tratamiento antimicrobiano (Rincón Acero *et al.*, 2011).

Además, se han establecido redes de vigilancia entre países para mejorar la detección de bacterias resistentes, lo cual ha contribuido significativamente a los estudios epidemiológicos y al control de brotes y epidemias en seres humanos. Algunos países desarrollados han implementado sistemas de seguimiento continuo de los serotipos de *Salmonella* spp. en animales domésticos, lo que les permite mantener una vigilancia constante de esta enfermedad zoonótica (Lewerin *et al.*, 2011).

La adopción de prácticas adecuadas de higiene personal y el manejo adecuado de los productos de origen animal, como el mantenimiento de la cadena de frío y una correcta cocción, son medidas preventivas fundamentales. Asimismo, es esencial promover el uso responsable de antimicrobianos en la medicina veterinaria para la producción animal, así como la rotación periódica de estos medicamentos en las instituciones de salud, con el objetivo de reducir la aparición de resistencia (Threlfall *et al.*, 2003).

Es importante tener en cuenta que controlar completamente el fenómeno de resistencia en un futuro cercano resulta difícil. Por lo tanto, se debe hacer hincapié en la implementación de medidas de control sanitario en la producción animal destinada al consumo humano. Años atrás ya se barajaba la posibilidad de implementar vacunas para inmunizar a los animales contra estos patógenos, pero debido a la complejidad de los múltiples serotipos y genes involucrados en las infecciones aún no era posible (Gamazo e Irache, 2007). Con el paso del tiempo se ha logrado crear vacunas comerciales para inmunizar a las aves y la mayoría en su formulación incluyen *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium*, además de otros serotipos distintos con la finalidad de proteger (Desin *et al.*, 2013).

### 1.5. Iniciativa "One Health" y microorganismos críticos.

El concepto de "One Health" se define como un enfoque interdisciplinario y colaborativo que reconoce que hay una conexión entre la salud humana, animal y ambiental. Se basa en el supuesto de que estos tipos de salud están intrínsecamente relacionados y que el bienestar de uno afecta directamente a los demás.

Muchas enfermedades pueden pasar de animales a humanos (zoonosis) y la salud de los ecosistemas tiene un impacto directo en la salud de las personas y los animales, por lo que se busca la colaboración de todo tipo de profesionales para prevenir, controlar las enfermedades y mejorar la salud en general (ISBG, 2021). La OMS colabora con los gobiernos nacionales, organizaciones no gubernamentales, instituciones académicas, así como con asociados regionales e internacionales para prevenir y controlar las amenazas zoonóticas y su impacto en la sociedad, economía y salud pública (WHO, 2021).

Este proyecto se centra en tres grandes bloques:

- La inocuidad de los alimentos.
- La lucha frente a las resistencias antibióticas.
- La vigilancia de las enfermedades zoonóticas y vectoriales.

El incremento de estas resistencias es una gran preocupación tanto para la sanidad animal, como humana, al igual que para la alimentación, economía y medioambiente. Además, las resistencias van a atrasar la cobertura sanitaria universal porque los costos de la atención de salud aumentarán, los fármacos serán más caros y serán necesarias cantidades más grandes debido a que habrá menos certeza en el diagnóstico y la cura (ISBG, 2021).

Para frenar la expansión de las resistencias antibióticas y contribuir en que se cumpla la iniciativa anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una lista global de bacterias resistentes con el fin de obtener nuevos antibióticos funcionales. Esta lista clasifica a los patógenos en tres categorías según su nivel de prioridad: crítica, elevada y media. En el grupo de prioridad crítica se encuentran bacterias multirresistentes de los hospitales o residencias, entre las que se encuentran la *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias resistentes a carbapenémicos. Todas las de este grupo se asocian con una elevada mortalidad y son potencialmente peligrosos, como la *Pseudomonas aeruginosa*, que genera resistencia a toda clase de antibióticos. En el nivel de prioridad elevada se encuentran *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp resistentes a fluoroquinolonas, *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a fluoroquinolonas y cefalosporinas, *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina y vancomicina, *Helicobacter pylori* con resistencia a la claritromicina y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. Por último, en el grupo de prioridad media aparecen *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y *Shigella* spp. resistente a fluoroquinolonas (WHO, 2017).

### **1.6. Objetivos de desarrollo sostenible.**

En septiembre del año 2015 se determinaron los objetivos de desarrollo sostenible con la finalidad de eliminar la pobreza, prosperar como sociedad y de proteger el planeta. Se pretende que se logren cumplir los objetivos propuestos en un periodo de 15 años, y para ello han de contribuir todos los ciudadanos sin excepción. Algunos de estos ODS están directamente relacionados con la resistencia antimicrobiana y su cumplimiento o no pueden determinar grandes cambios (Gamez, 2015).

El ODS número 1 se centra en erradicar la pobreza mundialmente. Si las resistencias antimicrobianas siguen creciendo, las personas con pocos recursos enferman con más frecuencia y el coste de los tratamientos sería cada vez más elevado, por lo que no podrían costearlos. Alcanzar este objetivo crearía una situación de igualdad y crecimiento económico, y en general, una estabilidad social. (WHO, 2021).

El ODS número 2 está relacionado con eliminar el hambre del mundo. En el ámbito de las resistencias, este objetivo está muy relacionado con los animales, ya que ellos también sufren enfermedades y cada vez serían más complicadas de tratar, por lo que la producción caería en picado y se pondrían en riesgo puestos de trabajo y la seguridad alimentaria. Lograr el hambre cero generaría acceso universal a los alimentos y sistemas alimentarios sostenibles que derivarían en una situación de estabilidad mundial, ya que también se evitarían conflictos (WHO,2021).

El ODS número 3 es el más importante, relacionado con la salud y el bienestar. Las resistencias antimicrobianas son las causantes de casi un millón de muertes al año, y se estima que en el futuro se aumente esta cifra considerablemente. Además, ya existen enfermedades muy resistentes como la tuberculosis multirresistente, las cuáles se fortalecerán y, por otro lado, el coste de los tratamientos aumentará y se creará una situación insostenible. Para lograr este objetivo es fundamental mejorar la atención sanitaria, evitar la falsificación de recetas antibióticas y, sobre todo, fomentar la vacunación, ya que disminuye la incidencia de patologías causadas por patógenos resistentes. Por otro lado, se busca la colaboración de todos los países, especialmente de los países en desarrollo, para adoptar más medidas preventivas, de forma que se pudieran detectar con mucha antelación estas resistencias. Adicionalmente los países deberían trabajar en reducir los riesgos y en la gestión de estos para establecer la salud nacional y mundial. Si se consiguiera este objetivo, se reduciría la mortalidad, fortalecerían los sistemas de atención médica y se alcanzaría una vida sana. (WHO,2021).

El trabajo decente y crecimiento económico corresponde con el ODS número 8, que, en este caso, los contagios por enfermedades causadas por las cepas resistentes generarían en los pacientes largos periodos de inactividad debido a las hospitalizaciones, tratamientos, o en algunos casos la muerte. Esto conllevaría la ausencia de los trabajadores y se producirían pérdidas económicas muy graves. Si se lograra el objetivo, se generaría un empleo justo y productivo para todos, con un impacto positivo en la economía. (WHO,2021).

La meta número 12 conlleva la producción y consumo responsables. Se han detectado antimicrobianos en residuos procedentes de fábricas de medicamentos, siendo en algunos casos extremadamente elevados, por lo que el riesgo de aparición o propagación de una enfermedad se ve aumentado. Cuando se reduzca la contaminación originada por la producción de antibióticos, los riesgos de aparición de cepas resistentes disminuirán notablemente. (WHO, 2021).

Por último, el objetivo de desarrollo sostenible número 17, alianzas para lograr objetivos, es fundamental porque se necesita la colaboración de todas las organizaciones sanitarias y algunas no sanitarias a nivel mundial). Si se cumpliera, la cooperación nacional se fortalecería y aceleraría aún más el progreso hacia el desarrollo sostenible (WHO, 2021).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente proyecto es analizar la calidad microbiológica y la presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos en carnes procedentes tanto de pollo como de cerdo adquiridas en diferentes comercios de la Comunidad Valenciana.

Este trabajo también cuenta con varios objetivos específicos:

- Analizar la calidad higiénico-sanitaria de las carnes a partir de análisis de presencia de *Salmonella* spp. y recuento de coliformes según la norma microbiológica.
- Aislar e identificar las cepas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y al género *Acinetobacter* capaces de crecer en medios suplementados con betalactámicos y carbapenemes.
- Estudiar las resistencias antibióticas fenotípicas de los aislados mediante la realización de antibiogramas a doce antibióticos de uso clínico, en especial a antibióticos betalactámicos, y carbapenemes, por su importancia en clínica y la necesidad de realizar una vigilancia epidemiológica de las resistencias a los mismos.
- Determinar la carga de resistencias antibióticas por tipo de muestra cárnica.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Origen y preparación de las muestras.

Para este proyecto se han seleccionado 30 muestras cárnicas procedentes de cerdo y pollo. Estas muestras se analizaron durante el periodo comprendido entre marzo y junio siguiendo los métodos que se van a explicar en este apartado. Las muestras se adquirieron en distintos establecimientos de Valencia, ya sea en supermercados locales o en carnicerías de barrio. De cada tipo de carne se seleccionaron partes muy diferentes para obtener mayor variabilidad. Todos estos datos se reflejan en la Tabla 1.

**Tabla 1: Muestras analizadas, procedencia, fecha y tipo.**

MUESTRA	COMERCIO	FECHA	ORIGEN	TIPO DE MUESTRA
C1	1	06/03/2023	Cerdo	Carne picada solo cerdo lomo cabeza
C2	2	28/03/2023	Cerdo	Carne picada solo cerdo
C3	1	28/03/2023	Cerdo	Carne picada solo cerdo cinta
C4	3	25/04/2023	Pollo	Cuello de pollo
C5	1	25/04/2023	Pollo	Muslos de pollo (arreglo)
C6	1	02/05/2023	Pollo	Muslos de pollo
C7	1	02/05/2023	Pollo	Cuarto trasero
C8	4	02/05/2023	Cerdo	Secreto de cerdo
C9	3	08/05/2023	Pollo	Carne picada de pollo
C10	3	08/05/2023	Cerdo	Carne picada de cerdo
C11	5	08/05/2023	Cerdo	Cabeza de lomo fileteada
C12	5	08/05/2023	Cerdo	Costilla de cerdo troceada
C13	6	08/05/2023	Pollo	Muslitos de pollo
C14	6	08/05/2023	Cerdo	Cabeza de lomo
C15	7	15/05/2023	Cerdo	Cerdo a tacos
C16	10	15/05/2023	Pollo	Hígado
C17	1	15/05/2023	Pollo	Cuarto trasero
C18	7	15/05/2023	Pollo	Solomillos de pollo
C19	7	15/05/2023	Cerdo	Filetes de lomo
C20	7	15/05/2023	Pollo	Alitas de pollo
C21	8	22/05/2023	Cerdo	Cerdo a tacos
C22	8	22/05/2023	Pollo	Carcasas de pollo
C23	1	29/05/2023	Cerdo	Estofado de cerdo
C24	1	29/05/2023	Pollo	Hígado de pollo
C25	9	05/06/2023	Cerdo	Troceado para guisar de cerdo
C26	10	05/06/2023	Pollo	Cuarto trasero de pollo
C27	1	05/06/2023	Pollo	Cuarto trasero de pollo
C28	9	05/06/2023	Pollo	Jamoncitos de pollo
C29	4	05/06/2023	Cerdo	Chuletas aguja cerdo
C30	4	05/06/2023	Pollo	Alas partidas

### 3.2. Análisis de la calidad de las muestras.

Las muestras se llevaron al laboratorio de Microbiología en la UPV en refrigeración en las 2 h siguientes a su adquisición y seguidamente se trataron de forma aséptica en cabina de flujo. En primer lugar, se tomaron 25 gramos de muestra representativa de cada pieza y se introdujeron en la bolsa Stomacher en condiciones de asepsia. A continuación, se añadió 225 mL de agua de Peptona Tamponada (Scharlau, Barcelona) esterilizada previamente y se homogeneizó en el Stomacher (BagMixer, Interscience) durante cinco minutos.

Una vez homogeneizada la muestra, se realizó el recuento de coliformes. La muestra homogeneizada correspondería con la primera dilución ( $10^{-1}$ ), y a partir de ahí se realizaron dos diluciones decimales adicionales hasta obtener la dilución de  $10^{-3}$ . Seguidamente se inoculó 0,1 mL de la muestra diluida en el medio Cromógeno de Coliformes (CC) por duplicado y se esparcen con el asa de plástico estéril. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Una vez incubadas las placas, se procedió al recuento de las colonias. Para ello, se utilizó un dispositivo especializado en contar colonias (Colony Counter (Digital S, PSelecta) que, con ayuda de una lupa y un sistema de conteo, se contaron las colonias rosas, azules y moradas.

El medio Cromógeno de Coliformes (CC) contiene dos sustratos cromógenos que, al ser utilizado por las bacterias, producen un color diferente. En el caso de las bacterias coliformes el color observado es el rojo porque tienen el enzima  $\beta$ -D- galactosidasa, y las colonias de *E. coli* se ven moradas o azul oscuro es porque presentan  $\beta$ -D- glucuronosidasa, además del enzima anterior.

Para nuestros resultados, elegimos las placas con las diluciones que presentaban entre 15 y 150 colonias para mayor fiabilidad. Cuando se determina la dilución con la que se trabaja se cuentan el número de colonias de ambas placas y se calculan las Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C/g) con la siguiente ecuación (Ec.1):

$$U.F.C/g = \frac{P1+P2}{2} \times d^{-1} \times 10$$

Ec.1

P1 y P2= número de colonias en cada placa

$d^{-1}$ : dilución correspondiente

Para poder realizar el aislamiento de *E. coli*, se seleccionaron las colonias azul oscuro, se sembraron en el medio Plate Count agar (Scharlau, Barcelona) y se incubaron en la estufa a 37 °C durante 24h, para posteriormente llevar a cabo la identificación mediante tiras API® 20E (Biomèrieux, Francia).

### 3.3. Estudio de la presencia de *Salmonella* spp.

Este análisis se llevó a cabo siguiendo la Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017: método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.

A partir de los 25g de muestra ya homogeneizados tal y como se describen en el apartado anterior, se incuba el preenriquecimiento en la estufa de  $37\pm 1$  °C durante  $18\pm 2$  h.

Una vez transcurrido este tiempo, se realiza el enriquecimiento selectivo en caldos de Rappaport (Scharlau, Barcelona) y Tetrionato (Scharlau, Barcelona) Por cada muestra se introduce 1mL en el medio de Tetrionato y se incuba en la estufa de  $37\pm 1$  °C durante  $24\pm 3$  horas y 0,1 mL en el medio de Rappaport, que será incubado a  $41,5\pm 1$  °C durante  $24\pm 3$  h.

Una vez incubados los tubos, se utilizan placas de Xilosa, Lisina y Desoxicolato (XLD) (Scharlau, Barcelona) y como segundo medio selectivo, el medio Cromógeno de Salmonella (CS) (OXOID, Reino Unido). Se siembra una placa procedente de cada tubo mediante triple estría de XLD y otra de CS por muestra, y se incuban en la estufa de  $37\pm 1$  °C  $24\pm 3$  horas.

Las colonias de *Salmonella* spp. en Agar XLD se presentan de color negro, pero este tipo de Agar permite el crecimiento de *Shigella* con mayor facilidad.

Por otra parte, de cada muestra se siembra a partir del agua de peptona crecida por triple estría en placa de MacConkey, medio específico para enterobacterias, con meropenem (Scharlau, Barcelona) (MC+M) y MacConkey con Cefotaxima (MC+C) (Scharlau, Barcelona) y se incuban a  $37\pm 1$ °C durante 24 horas para el estudio de otras enterobacterias.

Los medios de MacConkey que se han utilizado suplementados con antibióticos: 5mg/L de Vancomicina en ambos medios junto con 5 mg/L de Cefotaxima en uno y en el otro 1,5 mg/L de Meropenem. En este tipo de medios es común que presenten varias colonias, siendo interesantes las colonias blancas, por posibilidad de que se encuentre *Acinetobacter*, cremosas (*Pseudomonas*), o rosas y rojas tanto grandes como pequeñas, pudiendo ser pertenecientes al género *Enterobacter*, *Enterococcus* o *E. coli*.

Posteriormente a estas colonias se les ha realizado las pruebas bioquímicas y serológicas correspondientes para lograr una buena identificación.

### **3.4. Identificación y aislamiento de aislados.**

#### **3.4.1. Pruebas previas para la identificación**

Como primer paso para seleccionar las cepas aisladas primero necesitamos conocer si presentaban el sistema citocromo-oxidasa. Para ello se coge el cultivo deseado y se extiende sobre una tira reactiva de oxidasa (OXOID, Reino Unido), la cual virará a morado si es positiva y no virará si es negativa. El reactivo que reacciona con el cultivo es el tetrametil,1-4, fenilendiamina. Las pruebas de oxidasa negativa son las que se seleccionaron para este estudio.

Una vez confirmada la prueba de la oxidasa negativa, se hizo la prueba de la catalasa, en la que se deposita una gota de  $H_2O_2$  se observa si al entrar en contacto con la colonia en estudio se producen burbujas. La presencia de burbujas indica que la prueba de la catalasa es positiva y si no presenta burbujas es negativa. En este proyecto interesa que los aislados sean catalasa positiva.

En el análisis de *Salmonella* spp. las colonias negras procedentes de XLD y las rojas procedentes de CS se depositan en un medio TSI (agar hierro triple azúcar) (Scharlau, Barcelona) para observar si se fermentan los azúcares disponibles en el medio con el objetivo de identificar previamente enterobacterias. La identificación de la enterobacteria se confirma posteriormente a través de una tira API 20E.

### **3.4.2. Tinciones Gram**

Este procedimiento es empleado para poder realizar la clasificación de las bacterias según su capacidad para retener el colorante según la composición de su pared celular por lo que se utiliza como prueba diferencial. Los resultados pueden ser grampositivas, que son cocos o bacilos con coloración violeta, o gramnegativas, bacilos-teñidos de rosa.

### **3.4.3. Tiras API 20E**

Las tiras API® 20E (Biomérieux, Francia) es una batería de pruebas miniaturizadas que se utiliza para identificar bacterias de la familia Enterobacteriaceae y algunos bacilos gramnegativos no exigentes. Estas tiras contienen veinte pocillos, cada uno de ellos con diferentes sustratos. Se inoculan con una solución de agua en la que se suspende la colonia bacteriana que se está analizando, según indicaciones del fabricante.

Una vez inoculadas, las tiras se incuban en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Después de este tiempo, los pocillos habrán experimentado un cambio de color y en algunos de ellos se deben agregar reactivos específicos para llevar a cabo pruebas adicionales, una vez leídos los resultados se obtiene un perfil que se introduce en el programa apiweb® (<https://apiweb.biomerieux.com/>).

### **3.5. Estudio de las resistencias antibióticas**

Para el estudio de las resistencias antibióticas se realizaron antibiogramas mediante el método de disco-placa de Bauer-Kirby (CLSI, 2014). Los antibióticos que se han seleccionado para el estudio se presentan en la Tabla 2, y se obtuvieron de OXOID, Reino Unido, exceptuando CAL y CTL, procedentes de Liofilchem S.L.R, Italia. La selección se hizo en base a los usos principalmente en clínica y a la búsqueda específica de resistencias a cefalosporinas de 3ª generación y carbapenémicos.

El antibiograma se realizó con cultivo de 24h de las cepas aisladas previamente y a continuación, se tomó una colonia y se resuspendió en solución salina a hasta una turbidez de 0,5 en la escala McFarland,

Según indica la técnica, antes de que pasen 15 minutos, el hisopo se introduce en el tubo con el medio homogeneizado y se apoya en la pared para eliminar el exceso de líquido. A continuación, se esparce el inóculo en la placa de Mueller-Hinton (MH) (Scharlau, Barcelona) con movimientos horizontales, verticales y diagonales, de forma que no queda ningún espacio en la placa libre y pueda realizarse una lectura adecuada de los halos. Se deja secar la placa durante unos minutos antes de poner los discos por medio de un dispensador

Por último, se incubaron las placas a  $37 \pm 1$  °C en una estufa durante 24 horas. Después de este tiempo, se mide el diámetro de cada disco, teniendo en cuenta que cada uno mide 6 mm, utilizando una regla. Los valores obtenidos en mm se clasifican como sensibles, resistentes o intermedio según los valores que indica CLSI, 2014. Como cepa control se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

En este estudio se han utilizado algunos antibióticos combinados con ácido clavulánico. Estos son Cefotaxima y Ceftazidima. Si el diámetro para cualquiera de los antimicrobianos testados combinados con ácido clavulánico presenta un aumento mayor de 5 mm o similar respecto al antibiótico original, se consideran de espectro extendido, lo que quiere decir que presentan resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

**Tabla 2: antibióticos utilizados en el proyecto con sus respectivas concentraciones e intervalos.**

R: resistente; I: sensibilidad intermedia; S: sensible.

Grupo al que pertenecen	Antibiótico	Abreviatura	Concentración (µg)	Diámetro del halo (mm)		
				R	I	S
<b>β-lactámicos</b>	Amoxicilina	AMC	3	≤13	14-17	≥18
	Ampicilina	AMP	10	≤13	14-16	≥17
	Cefotaxima	CTX	30	≤22	23-25	≥26
	Cefotaxima+ ácido clavulánico	CTL	40	≥5 (CTX)	≥5 (CTX)	≥5 (CTX)
	Ceftazidima	CAZ	30	≤17	18-20	≥21
	Ceftazidima + ácido clavulánico	CAL	40	≥5 (CAZ)	≥5 (CAZ)	≥5 (CAZ)
	Ceftriaxona	CRO	30	≤19	20-22	≥23
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacino	CIP	5	≤15	16-20	≥21
	Ácido nalidíxico	NA	30	≤13	14-18	≥19
	Levofloxacino	LEV	5	≤13	14-16	≥17
<b>Carbapenemes</b>	Imipenem	IMP	10	≤19	20-22	≥23
<b>Fenicoles</b>	Cloranfenicol	C	30	≤12	13-17	≥18

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se han obtenido los siguientes resultados relacionados con la calidad higiénico-sanitaria, la identificación de cepas y las resistencias fenotípicas del análisis de las 30 muestras de carne estudiadas.

##### 4.1. Calidad higiénico-sanitaria

##### 4.1.1. Recuento y aislamiento de *E. coli*.

En la siguiente tabla se muestran las 30 muestras analizadas junto con la presencia de *E. coli* y su recuento, que varía desde valores menores a  $1,5 \times 10^3$  hasta  $4 \times 10^4$  UFC/g.

Tabla 3: Recuento y detección de *E. coli* por número de muestra, tipo de muestra y comercio.

MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	<i>E. coli</i> UFC/g	<i>E. coli</i> presencia
C1	Carne picada solo cerdo lomo cabeza	<1,5E+03	NO
C2	Carne picada solo cerdo	<1,5E+03	NO
C3	Carne picada solo cerdo cinta	<1,5E+03	NO
C4	Cuello de pollo	<1,5E+03	NO
C5	Muslos de pollo (arreglo)	<1,5E+03	NO
C6	Muslos de pollo	<1,5E+03	NO
C7	Cuarto trasero	<1,5E+03	NO
C8	Secreto de cerdo	<1,5E+03	NO
C9	Carne picada de pollo	<1,5E+03	NO
C10	Carne picada de cerdo	<1,5E+03	NO
C11	Cabeza de lomo fileteada	<1,5E+03	NO
C12	Costilla de cerdo troceada	<1,5E+03	NO
C13	Muslitos de pollo	<1,5E+03	NO
C14	Cabeza de lomo	<1,5E+03	NO
C15	Cerdo a tacos	<1,5E+03	NO
C16	Hígado	<1,5E+03	SÍ
C17	Cuarto trasero	<1,5E+03	SÍ
C18	Solomillos de pollo	<1,5E+03	SÍ*
C19	Filetes de lomo	<1,5E+03	NO
C20	Alitas de pollo	<1,5E+03	SÍ
C21	Cerdo a tacos	<1,5E+03	NO
C22	Carcasas de pollo	<1,5E+03	SÍ
C23	Estofado de cerdo	<1,5E+03	SÍ
C24	Hígado de pollo	<1,5E+03	NO
C25	Troceado para guisar de cerdo	<1,5E+03	SÍ
C26	Cuarto trasero de pollo	4,00E+03	SÍ
C27	Cuarto trasero de pollo	<1,5E+03	SÍ
C28	Jamoncitos de pollo	<1,5E+03	NO
C29	Chuletas aguja cerdo	<1,5E+03	SÍ*
C30	Alas partidas	<1,5E+03	SÍ

\*Presencia de *E. coli* no cuantificable.

Se detectó la presencia de *E. coli* en 11 de ellas (11/30). Para el resto de las cepas se indica el límite de detección de la técnica al no observarse crecimiento en las placas una vez incubadas.

En las muestras C5, C18 y C29 no se detectó la presencia de *E. coli* mediante el método del recuento de coliformes en CC. Sin embargo, en la muestra C18 sí se detectó a través de una colonia procedente del medio MacConkey suplementado con Cefotaxima, con una identificación del 99,9%, por lo que se ha considerado un resultado muy fiable. En la muestra C29 sucedió lo mismo. Este hecho puede deberse a que, aunque no se obtuvo *E. coli* en el recuento, la siembra en medio MacConkey con Cefotaxima se realizó previo enriquecimiento, por lo que, aunque su presencia era menor que el límite de detección en el recuento por CC, después de un enriquecimiento sí era detectable.

En total se analizaron 14 muestras de cerdo y 16 de pollo, de las cuáles 3 muestras de 14 de cerdo y 8 de 16 de pollo presentaron *E. coli*. De entre de las muestras de pollo, las que presentaron *E. coli* con mayor frecuencia fueron las procedentes de los cuartos traseros, ya que es una zona donde se sitúa el final del tracto digestivo (restos de cloaca) en la que se acumulan este tipo de bacterias, además de otras fecales.

La muestra C26 presentó un valor de  $4 \times 10^3$  UFC/g siendo esta la más alta de todas. El valor alto de *E. coli* encontrado en esta muestra se debe a que es un cuarto trasero en el que se incluye la cloaca, por lo que la concentración de este tipo de bacterias en esa zona es mayor. Además, procede de la carnicería *al detall* de un supermercado, por lo que podría haber estado almacenada en condiciones no controladas, y/o haber sido manipulada durante su venta, por lo que sufre mayor riesgo de contaminación.

Se consultó el Reglamento CE 2073/2005 que indica los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, concretamente el capítulo 2 referente a los criterios de higiene de los procesos en carnes y derivados. En dicho apartado el número máximo de UFC/g en *E. coli* admitido para carnes separadas mecánicamente y carne picada es mínimo de 50 y máximo de 500, pero en este caso no se detectó *E. coli* en este tipo de carnes. Para la carne fresca el límite no hay límite de *E. coli*, por lo que todas las muestras analizadas cumplirían con el criterio microbiológico y no suponen un riesgo si se procesan y consumen con buenas prácticas de manipulación.

#### **4.1.2. Detección y aislamiento de *Salmonella* spp.**

De las 30 muestras analizadas se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en 4 de 30 (n=30) (tabla 4). El 50% proceden de carne de pollo y el otro 50% de carne de cerdo. Todas las muestras proceden de supermercados.

Tabla 4: número de muestra, tipo de muestra, comercios y detección de *Salmonella* spp.

MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	<i>Salmonella</i> spp. /25 g Presencia
C1	Carne picada solo cerdo lomo cabeza	NO
C2	Carne picada solo cerdo	NO
C3	Carne picada solo cerdo cinta	NO
C4	Cuello de pollo	NO
C5	Muslos de pollo (arreglo)	NO
C6	Muslos de pollo	NO
C7	Cuarto trasero	NO
C8	Secreto de cerdo	NO
C9	Carne picada de pollo	NO
C10	Carne picada de cerdo	SÍ
C11	Cabeza de lomo fileteada	SÍ
C12	Costilla de cerdo troceada	NO
C13	Muslitos de pollo	NO
C14	Cabeza de lomo	NO
C15	Cerdo a tacos	NO
C16	Hígado	NO
C17	Cuarto trasero	NO
C18	Solomillos de pollo	NO
C19	Filetes de lomo	NO
C20	Alitas de pollo	NO
C21	Cerdo a tacos	NO
C22	Carcasas de pollo	NO
C23	Estofado de cerdo	NO
C24	Hígado de pollo	NO
C25	Troceado para guisar de cerdo	NO
C26	Cuarto trasero de pollo	SÍ
C27	Cuarto trasero de pollo	NO
C28	Jamoncitos de pollo	NO
C29	Chuletas aguja cerdo	NO
C30	Alas partidas	SÍ

La aglutinación proporciona la identificación de *Salmonella* spp. Poly A, para una de las salmonelas que es el tipo más común en alimentos.

Que una cepa *Salmonella* spp. Poly A quiere decir que los grupos posibles a los que puede pertenecer son los siguientes: A, B, D, E1, E2, E3, E4 Y L. En el laboratorio no se poseen los materiales suficientes para poder concretarlo, habría que enviar la cepa a otro laboratorio para su serotipado.

La muestra C10 fue la única que presentó aglutinación y mientras que las otras 3 cepas positivas para *Salmonella* spp. no la presentaron, lo que supone que pueden pertenecer a otros serogrupos.

En el Reglamento CE 2073/2005, referente a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, se consultó el capítulo 1 acerca de criterios de seguridad alimentaria. En este apartado se determina que la presencia de *Salmonella* spp. en 25 gramos tanto para la carne separada mecánicamente como para la carne picada y fresca ha de ser nula. Los resultados de las muestras C10, C11, C26 y C30 indican la presencia de *Salmonella* spp., por lo que la evaluación final es insatisfactoria y estas carnes no deberían de dispensarse y deberían de retirarse de la venta. Supondría una alerta sanitaria ya que pueden suponer un riesgo biológico y una posible fuente de toxiinfección.

#### 4.2. Aislamiento de cepas para el estudio de resistencias antibióticas

Tras el análisis de las 30 muestras en los distintos medios empleados se consiguieron un total de 166 cepas aisladas procedentes de los medios de aislamiento selectivo tanto de coliformes, y de detección de *Salmonella* spp., MacConkey suplementados con Cefotaxima y Meropenem, CC, XLD y CS (descritos en material y métodos). De estas cepas, 102 de ellas (61,4%) resultaron ser oxidasa positiva, por lo que se desechan, ya que se buscaban enterobacterias y estas no presentan este enzima. Las 64 cepas restantes (38,5%) fueron identificadas como oxidasa negativa, catalasa positiva y Gram negativas, ya que estas características corresponden con la familia Enterobacteriaceae y eran las interesantes para este estudio.

##### 4.2.1. Cepas de enterobacterias aislada del medio MacConkey suplementado con antibióticos.

En la siguiente tabla se puede observar la identificación mediante las tiras API®20E de las cepas aisladas procedentes de los medios de MacConkey suplementados con Cefotaxima y Meropenem, con su correspondiente % de ID.

Tabla 5: identificación de las cepas procedentes de medios MacConkey suplementados con antibióticos mediante tiras API 20E.

MUESTRA	CEPA	ID API 20E	% ID
C9	9MC2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	94,80%
C13	13MC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	94,80%
C18	18MC	<i>E. coli</i>	99,90%
C21 <sub>1</sub>	21MM	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98,70%
C21 <sub>2</sub>	21MC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	83,80%
C22	22MC	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98,70%
C25 <sub>1</sub>	25MC1	<i>Serratia odorifera</i>	99,90%
C25 <sub>2</sub>	25MC2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	91,60%
C25 <sub>3</sub>	25MC1	<i>Serratia odorifera</i>	99,90%
C29 <sub>1</sub>	29MC1	<i>Serratia ficaria</i>	94,20%
C29 <sub>2</sub>	29MC2	<i>E. coli</i>	99,90%
C30	30MC	<i>Serratia odorifera</i>	99,60%

Se observan que 5 de los aislados fueron identificados como *Acinetobacter baumannii* (C9, C13, C21<sub>1,2</sub> y C22); 2 de los aislados se identificaron como *E. coli* (C18 y C29<sub>2</sub>); uno de los aislados se correspondió con *Enterobacter aerogenes* (C25<sub>2</sub>); tres de los aislados fueron identificados como *Serratia odorifera* (C25<sub>1,3</sub> y C30); y uno de los aislados como *Serratia ficaria* (C29<sub>1</sub>).

El Agar MacConkey se ha utilizado para aislar las bacterias gramnegativas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, y todos los resultados han sido acordes a estos criterios. Sin embargo, se han aislado varias cepas de *Acinetobacter baumannii*, ya que son capaces de crecer bien en este tipo de agar, aunque se manifiestan con un color blanco, claramente diferente a las colonias típicas rosas de las enterobacterias.

La presencia de *Acinetobacter baumannii* en estos medios suplementados con antibióticos es interesante, ya que suelen poseer resistencias antibióticas por lo que se han considerado dentro del estudio. Esta bacteria ha presentado resistencia a dos familias de antibióticos de las utilizadas, y en otros estudios se ha detectado generalmente que presentan resistencias a la mayoría de los antibióticos que se analizan (Hart *et al.*, 2010). Es por eso por lo que se considera un patógeno emergente capaz de adquirir resistencias rápidamente debido a su genoma plástico (Esperbent *et al.*, 2017).

En la tabla 5 se muestran las 12 identificadas de las 15 aisladas en un principio. Las tres restantes no obtuvieron una buena identificación mediante este sistema y se descartaron para el estudio.

#### **4.2.2. Aislados de enterobacterias del medio Cromógeno de Coliformes.**

Se aislaron un total de 32 cepas procedentes del medio CC y se sometieron a la identificación mediante tiras API 20E. Los resultados obtenidos fueron en su gran mayoría cepas de *E. coli*. El resto de las cepas se identificaron como *Serratia marcescens* (C12), *Acinetobacter baumannii* (C17<sub>1</sub>) y *Kluyvera spp* (C25<sub>1</sub>).

En la tabla 6 se muestran las 32 identificadas de las 35 aisladas en un principio. Las tres restantes no obtuvieron una buena identificación mediante este sistema y se descartaron para el estudio.

Tabla 6: identificación de las cepas procedentes del medio CC mediante tiras API 20E.

MUESTRA	CEPA	ID API	% ID
C12	12E-1	<i>Serratia marcescens</i>	92,70%
C16	16E-1	<i>E. coli</i>	99,50%
C16	16E-1	<i>E. coli</i>	99,50%
C16	16E-2	<i>E. coli</i>	99,50%
C17 <sub>1</sub>	17E-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98,70%
C17 <sub>2</sub>	17E-3	<i>E. coli</i>	99,80%
C20	20E-1	<i>E. coli</i>	99,80%
C20	20E-1.2	<i>E. coli</i>	99,80%
C20	20E-3	<i>E. coli</i>	99,80%
C22	22E-1	<i>E. coli</i>	99,90%
C22	22A-1	<i>E. coli</i>	99,50%
C22	22-1B	<i>E. coli</i>	99,90%
C23	23E-1.1	<i>E. coli</i>	99,80%
C23	23E-1.2	<i>E. coli</i>	99,90%
C23	23E-1.2	<i>E. coli</i>	99,90%
C23	23E-1.3	<i>E. coli</i>	99,90%
C23	23E-2	<i>E. coli</i>	99,90%
C23	23E-2	<i>E. coli</i>	98,80%
C23	23E-2.3	<i>E. coli</i>	98,80%
C25 <sub>1</sub>	25E-1	<i>Kluyvera</i> spp.	97,00%
C25 <sub>2</sub>	25E-2	<i>E. coli</i>	99,70%
C26	26E-1.1	<i>E. coli</i>	99,70%
C26	26E-1.2	<i>E. coli</i>	99,90%
C26	26E-2.1	<i>E. coli</i>	99,70%
C26	26E-2.2	<i>E. coli</i>	99,70%
C26	26E-3.1	<i>E. coli</i>	99,70%
C26	26E-3.2	<i>E. coli</i>	99,70%
C27	27E1	<i>E. coli</i>	99,90%
C27	27E-1	<i>E. coli</i>	97,70%
C29	29E-1	<i>E. coli</i>	99,70%
C30	30E-1.1	<i>E. coli</i>	99,70%
C30	30E-1.2	<i>E. coli</i>	99,70%

#### 4.2.3. Aislados procedentes del medio Cromógeno de *Salmonella* spp.

En la tabla 7 se observan los resultados a partir de la identificación de las cepas procedentes de los medios empleados en la detección de *Salmonella* spp. (CS) según la norma ISO 6579-1:2017 con sus respectivos porcentajes de ID.

Tabla 7: identificación de las cepas procedentes de medios XLD, CS y mediante tiras API 20 E.

MUESTRA	CEPA	ID API	% ID
C10 <sub>1</sub>	10TS 1	<i>Salmonella</i> spp.	94,80%
C10 <sub>2</sub>	10TS 2	<i>Salmonella</i> spp.	98,60%
C10	10RS	<i>Salmonella</i> spp.	98,50%
C11	11TS	<i>Salmonella</i> spp.	99,99%
C17	17RS	<i>Salmonella</i> spp.	98,60%
C18	18TS	<i>Salmonella</i> spp.	91,80%
C24	24TS	<i>Enterobacter cloacae</i>	94%
C26	26RX	<i>Proteus mirabilis</i>	99,30%
C27	27TX	<i>Morganella morganii</i>	99,90%
C30	30RX	<i>Enterobacter cloacae</i>	94%

Se identificaron 6 cepas de *Salmonella* spp. (C10<sub>1,2</sub>, C10, C11, C17 y C18); uno de los aislados fue identificado como *Morganella morganii* (C27); 2 de los aislados se identificaron como *Enterobacter cloacae* (C24 y C30); 2 de los aislados fueron identificados como *Proteus mirabilis* (C26 y C27).

En la tabla 7 se muestran las 10 identificadas de las 14 aisladas en un principio. Las cuatro restantes no obtuvieron una buena identificación mediante este sistema y se descartaron para el estudio.

#### 4.3. Resistencias fenotípicas.

En la tabla 8 se observan las resistencias antibióticas que se encontraron en los aislados procedentes de los diferentes tipos de carne junto con el número de muestra.

De las cepas analizadas, 7 de ellas no presentaron resistencia frente a ningún antibiótico y 10 de ellas solamente presentaron resistencia a un solo antibiótico. Supone un porcentaje bajo de bacterias sensibles.

Se encontraron 11 perfiles de resistencia diferentes para las 31 cepas restantes, de los cuales, el 9% estuvieron formados por una única familia de antibióticos, en este caso betalactámicos. El resto de los patrones resistentes estaban formados por antibióticos procedentes de la familia de betalactámicos y quinolonas (27,2%), de antibióticos procedentes de la familia de betalactámicos y fenoles (36,3%) y el resto, por tres familias diferentes de antibióticos (27,27%). El patrón más repetido fue AMC-AMP-NA, con 6 cepas procedentes del medio Cromógeno de Coliformes (CC), de ellas 4 provenientes de muestras de carne cerdo y 2 de carne de pollo. El segundo patrón más repetido fue AMC-NA, con 5 cepas procedentes del medio CC, todas provenientes de cerdo y de la misma muestra.

Tabla 8: patrones de resistencia encontrados en el estudio.

Patrones de resistencia	Cepas	Código	Tipo de muestra cárnica	Muestra implicada
AMC-NA	5	E13, E14, E15, E16, E17	Cerdo	C23
AMC-AMP-C	3	S3, S4,S5	Cerdo	C10
AMC-AMP-CRO	1	M3	Pollo	C18
AMC-AMP-NA	6	E1, E2, E3, E6, E12, E22	Cerdo (E1, E2, E3, E12), pollo (E6, E22)	C16 (E1, E2, E3), C20, C26 (E6, E22)
AMC-C-CTX	1	M1	Pollo	C9
AMC-C-NA	3	M7,E18, S8	Cerdo	C25
AMC-AMP-CIP-NA	3	E21, E23, E24	Pollo	C24
AMC-C-CRO-CTX	1	M5	Cerdo	C21
AMC-AMP-C-CAZ-CRO	4	M6, S6, E10, E8	Pollo	C22
AMC-AMP-C-CIP-CRO	2	M11, E29	Pollo	C30
AMC-C-CAZ-CRO-NA	2	M9, M10	Cerdo	C29

Las cepas multirresistentes encontradas en la muestra C29 de cerdo procedente de MacConkey suplementado con Cefotaxima corresponden a *Serratia ficaria* (M9) y *Serratia odorifera* (M11).

En la muestra C25 de cerdo, las tres cepas detectadas en la muestra corresponden a *Serratia odorifera*, *Enterobacter cloacae* y *E. coli*, procedentes de medio de MacConkey suplementado con Cefotaxima, Cromógeno de *Salmonella* (CS) y Cromógeno de Coliformes (CC) respectivamente.

En la muestra C30 procedente de pollo, se identificaron las cepas multirresistentes como *E. coli* y *Serratia odorifera*, procedentes de medio Cromógeno de Coliformes y de MacConkey con Cefotaxima respectivamente.

El género *Serratia* presenta patógenos frecuentemente resistentes, pero los tratamientos que incluyan alguno de los siguientes antibióticos serviría para hacer frente a la enfermedad causada: Ciprofloxacino, Levofloxacino, Imipenem o Cefotaxima (Harris *et al.*, 2016). En este caso, ambas cepas no son resistentes a ninguno de estos antibióticos, por lo que la enfermedad causada por estas bacterias podría ser tratada con antibióticos carbapenémicos y quinolonas, exceptuando el Ácido Nalidíxico que no tiene uso en clínica para el cual sí resultó ser resistente.

En cuanto a *Enterobacter cloacae*, presenta resistencia intrínseca a penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda y algunas de tercera generación. Además de la resistencia a los betalactámicos, esta bacteria alberga una variedad de genes de resistencia a antibióticos de varias clases, como a aminoglucósidos o carbapenemes (Annavajhala *et al.*, 2019). En el presente estudio la cepa es resistente a Ampicilina, Cloranfenicol y al Ácido Nalidíxico, además de ser sensible al Imipenem, por lo que los resultados no contrastan. Esto puede ser debido a que la bacteria presenta una resistencia intrínseca. La enfermedad causada por esta bacteria

podría ser tratada con carbapenémicos y quinolonas, ya que no se obtuvo un resultado de resistencias en ninguna de estas familias.

Respecto a *E. coli*, Ruiz et al. (2018) hicieron un estudio en el que se analizaron 138 muestras de carne para determinar la presencia de enterobacterias y *E. coli*, además de sus resistencias fenotípicas. En el cerdo observaron que el 95% de los aislados de *E. coli* presentaron resistencia a la Ampicilina, el 90% a Tetraciclina, 60% a Ácido Nalidíxico y un 54,5% al Cloranfenicol, además de presentar resistencia a otras quinolonas en menor medida. Estos resultados están en consonancia con nuestro estudio. En el mismo estudio, en pollo, el 100% de los antibióticos presentaron resistencia a Cotrimoxazol, más del 90% a Ampicilina y Tetraciclina, y más del 80% fueron resistentes al Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacino y Cloranfenicol. Con estos datos se demuestra que *E. coli* es una cepa con gran cantidad de resistencias y haciendo una comparación con este trabajo, destaca la resistencia a las penicilinas, sobre todo a la Ampicilina casi en un 70%, al Ácido Nalidíxico en un 55% y algunas resistencias a las cefalosporinas. Aunque el número de muestras utilizado sea menor que el del estudio (138 frente a 30), la resistencia a las penicilinas y al Ácido Nalidíxico coinciden. En cambio, muy pocas cepas de *E. coli* presentaron resistencia al Cloranfenicol y al Ciprofloxacino. Esto puede deberse a que las cepas de *E. coli* aisladas en nuestro estudio hayan desarrollado mayor sensibilidad o que este antibiótico se usa en menor medida que los anteriores.

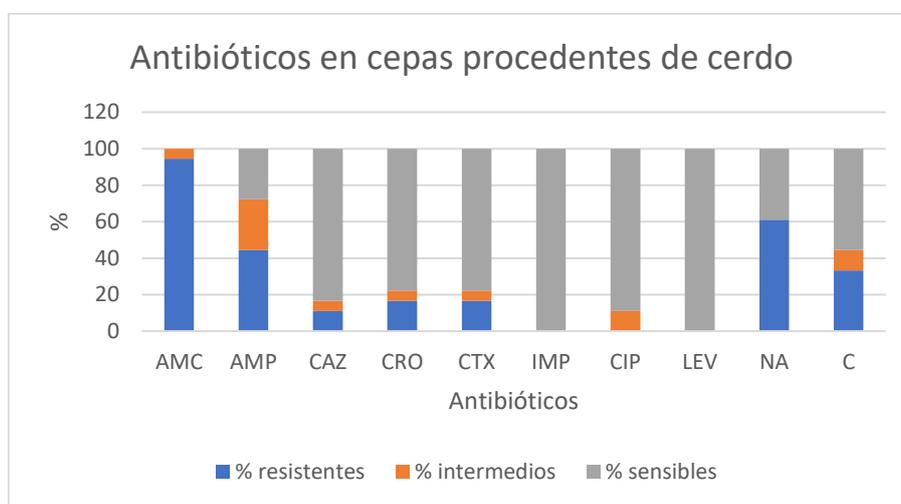
Por otra parte, también destaca del estudio de Ruiz et al. (2018) la ausencia de resistencias en antibióticos carbapenémicos, siendo un resultado que coincide con el presente trabajo (Ruiz et al., 2018). Por tanto, las infecciones causadas por este tipo de bacterias podrían ser tratadas con antibióticos de uso clínico como son los carbapenémicos y algunas quinolonas como el Levofloxacino, ya que también demostró ser completamente sensible.

Respecto a otras resistencias antibióticas encontradas en cepas de *E. coli*, se realizó un estudio en Argentina, en el que se aislaron cepas de *E. coli* de distintos pacientes y un 22, 18% resultaron ser resistentes a Ciprofloxacino (Vidoni et al., 2020); en otro solamente el 1,1% de las muestras de *E. coli* resultaron ser resistentes a Ceftriaxona (Obaidat et al., 2017); en cuanto a la Ceftazidima, se realizó una investigación en la que las muestras de pollo de diferentes lugares del mundo presentaban una resistencia del 3% a este antibiótico (Roth et al., 2019), y por último, en el caso del Ácido Nalidíxico, diversas publicaciones y encuestas muestran que el uso de este antimicrobiano ha disminuido con el paso de los años debido a su ineficacia y al no usarse en clínica (Awogbemi et al., 2018). Los valores de Ciprofloxacino y Ceftriaxona se ajustan a los obtenidos en este trabajo, en cambio la Ceftazidima resultó ser totalmente sensible.

Son consideradas cepas multirresistentes aquellas que presentan resistencia a tres familias de antibióticos o más (Magiorakos et al., 2012). Anteriormente se ha mencionado la existencia de cepas que cumplen con estos requisitos, siendo en este caso 7 cepas que presentan resistencia a la familia de betalactámicos, quinolonas y fenoles. Este hecho es preocupante, ya que puede suponer un problema en caso de que fuera necesario el uso de terapia antibiótica.

Dependiendo del país, se pueden encontrar porcentajes de multirresistencia muy variados. Por ejemplo, en Suecia se han detectado hasta un 3% de cepas multirresistentes, y en Islandia

menos del 15% (Thorsteinsdottir *et al.*, 2010), en otros como en Túnez, 44% (Abbassi *et al.*, 2017), y China hasta un 81% (Wang *et al.*, 2016). Esta diferencia de porcentajes se debe a que en los países nórdicos está prohibido el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento y profilaxis, en cambio en el resto mencionados no. Suecia pertenece a la Unión Europea, igual que España, que es el país en el que se ha realizado el presente trabajo. Por lo tanto, el bajo número de muestras multirresistentes en el presente trabajo se debe a que en la Unión Europea el uso de antibióticos para el crecimiento y profilaxis está prohibido, por lo que las resistencias no se producen. Por otra parte, hay que tener en cuenta que esta investigación se hizo con 12 antibióticos de los cuáles 7 de ellos pertenecen a una misma familia. Si se hubiesen utilizado antibióticos de familias diferentes, los valores de multirresistencia podrían haberse visto alterados.



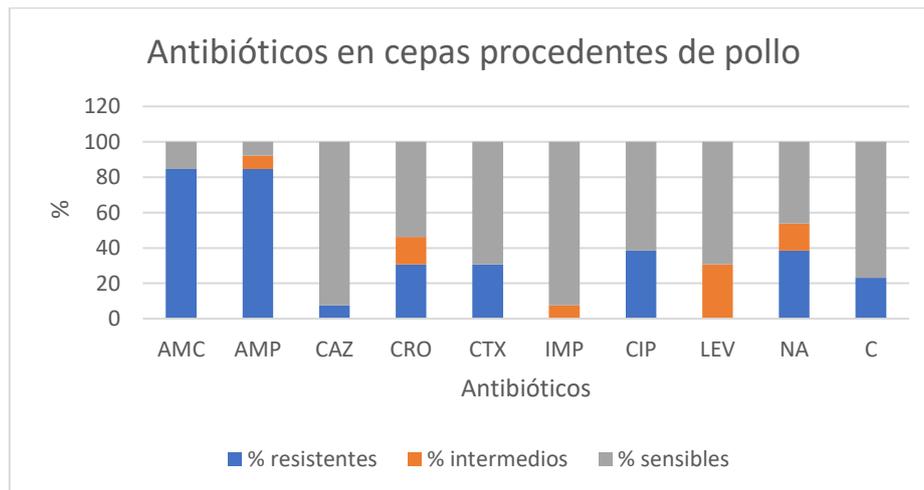
**Gráfico 1: antibióticos resistentes, intermedios y sensibles encontrados en los aislados procedentes de muestras de cerdo.**

AMC: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CAZ: Cefotaxima ; CRO: Ceftriaxona; CTX: Cefotaxima; CIP: Ciprofloxacino; IMP: Imipenem; LEV: Levofloxacino; NA: Ácido Nalidíxico; C: Cloranfenicol.

Los resultados de los antibiogramas procedentes de los aislados de las muestras de cerdo (gráfico 1) revelan que el mayor porcentaje de resistencia está asociado a la familia de betalactámicos, especialmente frente a la penicilina AMC (94,4%). Seguido de este antibiótico, destaca que un 61,1% de las cepas aisladas presentaron resistencia a la quinolona NA, un 44,4% a la penicilina AMP; un 33,3% al fenicol C; un 16,6% a las cefalosporinas CRO y CTX y por último un 11,1% a la cefalosporina CAZ. Por el contrario, exceptuando el Ácido Nalidíxico, las quinolonas fueron los antibióticos más susceptibles, destacando la ausencia de cepas resistentes a Levofloxacino y Ciprofloxacino. Esto también ocurre en el carbapenémico Imipenem, que no ha presentado resistencia. No hubo cepas aisladas que no presentaran resistencia a al menos un antibiótico. En la mayoría de los estudios se confirma que los aislados procedentes del cerdo son resistentes a las penicilinas, especialmente a la Ampicilina y sensibles al Levofloxacino y carbapenémicos. También destacan la resistencia del ácido

Nalidíxico en mayor o menor medida y algunas resistencias en Cloranfenicol (Lewerin *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2018; Yassin *et al.*, 2017). Los valores de este estudio respecto al cerdo se parecen en gran medida a los estudios contrastados y aunque haya variaciones, se podrían considerar unos resultados válidos.

En cuanto a las bacterias multirresistentes aisladas en este estudio, 5 de ellas proceden de carne de cerdo, siendo estas *Serratia ficaria*, *Serratia odorifera* (2), *Enterobacter cloacae* y *E. coli*, han manifestado mucha resistencia a penicilinas, algo a quinolonas, fenoles y cefalosporinas.



**Gráfico 2: antibióticos resistentes, intermedios y sensibles encontrados en los aislados procedentes de muestras de pollo.**

AMC: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; CTX: Cefotaxima; CIP: Ciprofloxacino; IMP: Imipenem; LEV: Levofloxacino; NA: Ácido Nalidíxico; C: Cloranfenicol.

En los microorganismos aislados analizados fenotípicamente procedentes del pollo (gráfico 2) se registró que el mayor porcentaje de resistencia está asociado con las penicilinas, de la familia de los antibióticos betalactámicos, siendo estas AMC (84,6%) y AMP (84,6%). Seguido de estos dos antibióticos, destaca la resistencia a la quinolona NA (38,4%); un 38,4% presentaron resistencia a la quinolona CIP; un 30,7% de resistencia corresponde con las cefalosporinas CRO y CTX; el Cloranfenicol mostró una resistencia del 23%, y, por último, la cefalosporina CAZ solo obtuvo un 7,7% de resistencia. Por el contrario, de todas las quinolonas analizadas, solamente Levofloxacino presentaba total susceptibilidad, al igual que ocurrió con el Imipenem, antibiótico carbapenémico. En este caso, todas las cepas que no presentaron resistencias procedieron de las muestras analizadas de pollo, siendo estas E4, E5, E19, E20, E25, E26 y S9. Como ha ocurrido con el cerdo, varios estudios destacan un gran porcentaje de resistencia a las penicilinas y en parte al Ácido Nalidíxico (Ruiz *et al.*, 2018; Yassin *et al.*, 2017). En el pollo se han observado tendencias crecientes de resistencia a los antibióticos pertenecientes a la familia de las quinolonas (AESAN, 2022), pero en nuestro estudio apenas se han detectado resistencias a esta familia, solo el Ciprofloxacino, el resto fueron sensibles o

intermedios. Este resultado se considera positivo ya que se mantiene la sensibilidad a estos antibióticos por lo que su uso se considera eficaz para su tratamiento en caso de infección.

En cuanto a las cepas multirresistentes encontradas en el estudio, los 2 restantes proceden del pollo, siendo estas *Serratia odorifera* y *E. coli* y presentando un alto porcentaje de resistencia a las penicilinas, algunas quinolonas, fenicoles y cefalosporinas.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos respecto a *E. coli* son favorables, ya que las cantidades de UFC/g detectadas en las muestras de carne han cumplido con el criterio microbiológico establecido. Ninguna muestra ha sobrepasado el límite establecido lo que indica que la carne resulta apta para el consumo humano, siempre y cuando se cumplan las normas de higiene y manipulación de estos alimentos.

En una muestra de pollo se encontraron valores más altos de *E. coli*, aunque cumplía con la norma. Esta muestra de cuarto trasero de pollo contenía parte de la cloaca, por lo que se demuestra que dependiendo de la parte del animal que se consuma, se encontrará un microorganismo u otro en mayor o menor cantidad, por ello hay que mantener una correcta manipulación e higiene para evitar la contaminación cruzada y garantizar el adecuado cocinado.

La detección de *E. coli* en las muestras no mostró dependencia del comercio donde se compraron, sin embargo, en todos los casos se aislaron más cepas en la carne de pollo.

Se aisló *Salmonella* spp. en cuatro de las muestras analizadas, lo que significa que no cumplían con el criterio microbiológico establecido. Aunque se sabe que un cocinado adecuado elimina el patógeno, sigue existiendo un riesgo debido a la necesidad de manipular correctamente estos alimentos para evitar contaminaciones cruzadas.

Tanto las muestras de pollo como las de cerdo presentaron *Salmonella* spp. por igual, lo que sugiere que el tipo de carne y la presencia del patógeno en este estudio son independientes tanto del tipo de carne como del establecimiento.

En cuanto a la identificación de las cepas de interés en los distintos medios, se detectaron 8 tipos de bacterias resistentes a antibióticos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, este hecho supone un potencial riesgo para su consumo sobre todo en pacientes inmunomprometidos.

Tanto en pollo como en cerdo no se ha detectado ningún tipo de resistencia a los antibióticos carbapenémicos ni a Levofloxacino y las resistencias más frecuentes han sido las de Amoxicilina y Ampicilina, ya que estas son penicilinas muy usadas en muchos ámbitos, ya sea en hospitales o en la industria alimentaria.

Se detectaron 7 bacterias multirresistentes y otras cepas han presentado resistencia a uno o dos antibióticos por lo que su vigilancia se hace necesaria para garantizar una correcta seguridad alimentaria de estos productos.

## 6. REFERENCIAS

- ABBASSI, M. S., KILANI, H., ZOUARI, M., MANSOURI, R., OUSSAMA, E. F. (2017). Antimicrobial Resistance in Escherichia Coli Isolates from Healthy Poultry, Bovine and Ovine in Tunisia: A Real Animal and Human Health Threat. *J Clin Microbiol Biochem Technol*, 3(2), 019-023.
- AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN (AESAN). (2022, marzo 29). *Publicación del Informe de la Unión Europea sobre la resistencia a los antimicrobianos en bacterias zoonóticas e indicadoras de humanos, animales y alimentos en 2019-2020*. Gob. Es [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias\\_y\\_actualizaciones/noticias/2022/informe\\_resistencia\\_antimicrobianos.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2022/informe_resistencia_antimicrobianos.htm)
- ANAHORY, T., DARBAS, H., ONGARO, O., JEAN-PIERRE, H., & MION, P. (1998). *Serratia ficaria*: a misidentified or unidentified rare cause of human infections in fig tree culture zones. *Journal of clinical microbiology*, 36(11), 3266-3272.
- ANNAVAJHALA, M. K., GOMEZ-SIMMONDS, A., & UHLEMANN, A. C. (2019). Multidrug-resistant Enterobacter cloacae complex emerging as a global, diversifying threat. *Frontiers in microbiology*, 10, 44.
- ASHBOLT, N. J., AMÉZQUITA, A., BACKHAUS, T., BORRIELLO, P., BRANDT, K. K., COLLIGNON, P & TOPP, E. (2013). *Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance*. Environmental health perspectives, 121(9), 993-1001.
- ASOCIACIÓN NACIONAL DE INDUSTRIAS DE LA CARNE ESPAÑOLA (2022). El sector cárnico español.
- AWOGBEMI, J., ADEYEYE, M., & AKINKUNMI, E. O. (2018). A survey of antimicrobial agents usage in POULTRY farms and antibiotic resistance in Escherichia coli and Staphylococci isolates from the poultry in Ile-Ife, Nigeria. *J Infect Dis Epidemiol*, 4(1), 1-8.
- BECERRA, A. (2021, diciembre 7). Superantibióticos vs bacterias panresistentes: la guerra que la humanidad va perdiendo. *SER*. [https://cadenaser.com/programa/2021/12/07/hora\\_25/1638896199\\_112268.html](https://cadenaser.com/programa/2021/12/07/hora_25/1638896199_112268.html)
- BLANCO, J. (2012). Escherichia coli enteroagregativa O104: H4-ST678 productora de Stx2a. ¿Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC!. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2), 84-89.
- BUSH, L. M., & VAZQUEZ-PERTEJO, M. T. (2023, 20 mayo). Infecciones por ProteeAE. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-proteeae>
- CHAUDHRY, S. B., VEVE, M. P., & WAGNER, J. L. (2019). Cephalosporins: a focus on side chains and  $\beta$ -lactam cross-reactivity. *Pharmacy*, 7(3), 103.
- DAVIN-REGLI, A., & PAGÈS, J. M. (2015). Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 6, 392.
- DEPARES, B. (2022, 30 diciembre). El sector cárnico lidera la industria española de alimentos y bebidas, C-Cárnica.

- DESIN T. S., KÖSTER W., POTTER AA. (2013) Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccines*. 12 :87-96.
- ECDC (2019). *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. Stockholm: ECDC. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/carbapenem-resistant-enterobacteriaceae-risk-assessment-rev-2.pdf>
- GAMAZO, C., & IRACHE, J. M. (2007). Salmonella vaccines. *Communicating Current Research and Educational and Trends in Applied Microbiology (A. Méndez-Vilas Editor)*, 518-524.
- GAMEZ, M. J. (2022, 24 mayo). *Objetivos y metas de desarrollo sostenible - Desarrollo Sostenible. Desarrollo Sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible>
- GIONO-CEREZO, S., SANTOS-PRECIADO, J. I., RAYO MORFÍN-OTERO, M. D., TORRES-LÓPEZ, F. J., & ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 172-180.
- GÓMEZ, J., GARCÍA-VÁZQUEZ, E., & HERNÁNDEZ-TORRES, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 1-9.
- HARRIS, P. N., WEI, J. Y., SHEN, A. W., ABDILE, A. A., PAYNTER, S., HUXLEY, R. R., ... & PATERSON, D. L. (2016). Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bloodstream infections caused by Enterobacter, Citrobacter or Serratia species: a systematic review with meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(2), 296-306.
- HART CASARES, M., ESPINOSA RIVERA, F., HALLEY POSADA, M. D. C., MARTÍNEZ BATISTA, M. L., & MONTES DE OCA MÉNDEZ, Z. (2010). Resistencia a antibióticos en cepas de Acinetobacter baumannii aisladas de enero a marzo del 2010 en el Hospital Clínicoquirúrgico " Hermanos Ameijeiras". *Revista cubana de medicina*, 49(3), 218-227.
- HUTCHINGS, M. I., TRUMAN, A. W., & WILKINSON, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80.
- INSTITUO DE SALUD GLOBAL BARCELONA. (4 de junio de 2021). *One Health (una sola salud) o cómo lograr a la vez una salud óptima para las personas, los animales y nuestro planeta*. <https://www.isglobal.org/healthisglobal/-/custom-blog-portlet/one-health-una-sola-salud-o-como-lograr-a-la-vez-una-salud-optima-para-las-personas-los-animales-y-nuestro-planeta/90586/0>
- INSTITUTO DE SALUD CARLOS III. (14 de abril de 2023). *¿Qué es One Health? Una sola salud humana, animal y ambiental*. <https://www.isciii.es/InformacionCiudadanos/DivulgacionCulturaCientifica/DivulgacionISCIII/Paginas/Divulgacion/DivulgacionOneHealth.aspx>
- KAI, M., CRESPO, E., CRISTESCU, S. M., HARREN, F. J., FRANCKE, W., & PIECHULLA, B. (2010). Serratia odorifera: analysis of volatile emission and biological impact of volatile compounds on Arabidopsis thaliana. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 965-976.
- KHANNA, A., KHANNA, M., & AGGARWAL, A. (2013). Serratia marcescens-a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. *Journal of*

- LEWERIN, S. S., SKOG, L., FRÖSSLING, J., & WAHLSTRÖM, H. (2011). Geographical distribution of salmonella infected pig, cattle and sheep herds in Sweden 1993-2010. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 1-8.
- LIU, H., ZHU, J., HU, Q., & RAO, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 50, 10-17.
- MAGIORAKOS, A. P., SRINIVASAN, A., CAREY, R., CARMELI, Y., FALAGAS, M., GISKE, C., . . . HINDLER, J. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant acteria: an international expert proposal for interim standard definitios for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.
- MARSTON, H. D., DIXON, D. M., KNISELY, M., PALMORE, T. N., & FAUCI, A. S. (2016). Resistencia antimicrobiana. *JAMA*, 316(11), 1193-204.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (MAPA), (2022). Informe del consumo de alimentación en España 2021. Gobierno de España, 186-195.
- MONGE, K. (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de Costa Rica y centroamérica*, 70(608), 599-605. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=47783>
- OBAIDAT, M. M., AL-ZYLOUD, A. A., SALMAN, A. B., DAVIS, M. A. (2017). Antimicrobial use and resistance among commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. *enterica* in rural Jordan small ruminant herds. *Small ruminant research*, 149, 99-104.
- ODRIOZILA, E., MONTONE, P., MORENO, G., NAVARRO, M., & VILLA, M. (2008). Salmonelosis en hembras lecheras. *XVII Reunión Científica y Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Santa fe, Argentina.*
- OISETH, S., JONES, L., & MAZA GUIA, E. (2022). Carbapenémicos y aztreonam. Lectorio. <https://www.lectorio.com/es/concepts/carbapenemicos-y-aztreonam/>
- REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 338, de 15 de noviembre de 2005.
- RINCÓN ACERO, D. P., RAMÍREZ RUEDA, R. Y., & VARGAS MEDINA, J. C. (2011). Transmisión de *Salmonella enterica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(2), 167-177.
- RIVERA LG, MOTTA PA, CERÓN MF, CHIMONJA FA. (2012). Resistencia de la Salmonela a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *Rev CES Med Vet Zotec*; Vol 7(1):115-127
- ROTH, N., KÄSBOHRER, A., MAYRHOFER, S., ZITZ, U., HOFACRE, C., & DOMIG, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry science*, 98(4), 1791-1804.

- RUIZ, J. D., SUÁREZ, M. C., & URIBE, C. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Salmonella* spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(3), 297-305.
- RUIZ-ROLDÁN, L., MARTÍNEZ-PUCHOL, S., GOMES, C., PALMA, N., RIVEROS, M., OCAMPO, K., ... & PONS, M. J. (2018). Presencia de Enterobacteriaceae y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 35, 425-432.
- TREVIÑO, N., & MOLINA, N. (2022). Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. Material de Cátedra. *Microbiología y Parasitología*.
- SALMON-ROUSSEAU, A., MARTINS, C., BLOT, M., BUISSON, M., MAHY, S., CHAVANET, P., & PIROTH, L. (2020). Comparative review of imipenem/cilastatin versus meropenem. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 50(4), 316-322.
- SANTOS, F. S., & PALOMERA, M. M. (2021). *Kluyvera* spp y *Kocuria* spp patógenos nosocomiales emergentes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 41(1), 5-5.
- SUÁREZ, C., & GUDIOL, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116-129.
- THORSTEINSDOTTIR, T. R., HARALDSSON, G., FRIDRIKSDOTTIR, V., KRISTINSSON, K. G., & GUNNARSSON, E. (2010). Broiler chickens as source of human fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Iceland. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 133.
- THRELFALL, E. J., FISHER, I. S. T., BERGHOLD, C., GERNER-SMIDT, P., TSCHÄPE, H., CORMICAN, M., ... & EDWARDS, G. (2003). Resistencias a fármacos antimicrobianos en aislamientos de *Salmonella enterica* procedentes de casos de salmonelosis humana en Europa, año 2000: resultados de la vigilancia internacional multicéntrica. *Eurosurveillance*, 8(2), 41-45.
- VANEGAS-MÚNERA, J. O. H. A. N. N. A., RONCANCIO-VILLAMIL, G., & JIMÉNEZ-QUICENO, J. N. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Medicina*, 28(2), 233-246.
- VÁSQUEZ, B. (2022, 19 enero). ¿Cuánta carne consumen los españoles y de dónde procede? La Vanguardia. <https://www.lavanguardia.com/comer/al-dia/20220118/7994439/que-tipos-kilos-carne-consumen-espanoles.html>
- VIDONI, G. E., PIZARRO, N. C., & GIAI, M. (2020). Resistencia a ciprofloxacina en infecciones urinarias por *Escherichia coli*.
- WANG, Y., YI, L., WANG, Y., WANG, Y., CAI, Y., ZHAO, W., & DING, C. (2016). Isolation, phylogenetic group, drug resistance, biofilm formation, and adherence genes of *Escherichia coli* from poultry in central China. *Poultry science*, 95(12), 2895-2901.
- WERTH, B. J. (2023, 20 mayo). Penicilinas. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/penicilinas>

- WHO (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics* <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO. (2020). *Zoonosis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>
- WHO. (2021). *Antimicrobial resistance and the United Nations sustainable development cooperation framework: guidance for United Nations country teams*
- YANG, S. C., LIN, C. H., ALJUFFALI, I. A., & FANG, J. Y. (2017). Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of microbiology*, 199, 811-825.
- YASSIN, A. K., GONG, J., KELLY, P., LU, G., GUARDABASSI, L., WEI, L., ... & WANG, C. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PLoS one*, 12(9), e0185326.