

# **TRABAJO FINAL DE MÁSTER**

## **MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**Estudio de la sensibilidad antimicrobiana de  
cepas de *Salmonella* spp. y *Listeria  
monocytogenes* aisladas de lácteos,  
ovoproductos y pescado.**

Valencia, septiembre de 2014

Autora: Dña. Laura Calabuig Jiménez

Directoras: Dr. Ana I. Jiménez Belenguer

Dr. Eva M<sup>a</sup> Doménech Antich

## 1. Resumen

El género *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* son patógenos que afectan a la salud de personas y animales, este hecho produce la necesidad de realizar tratamientos con antibióticos. Su uso inadecuado es la principal causa de resistencia antimicrobiana, lo que supone un problema en el tratamiento clínico de enfermedades. En este contexto, el objetivo es evaluar la sensibilidad antimicrobiana de diferentes cepas de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* aisladas de lácteos, ovoproductos y pescados. La resistencia a antibióticos se evaluó según el protocolo del CLSI, sobre 12 antimicrobianos seleccionados por su importancia en uso clínico. Los resultados sobre las cepas de *Salmonella* spp. mostraron que el porcentaje de resistencias varió en función del origen del aislado y se obtuvo que la prevalencia fue en orden decreciente: ampicilina (29%), ácido nalidíxico (21%), ceftriaxona (13%), amoxicilina- ácido clavulánico (13%), tetraciclina (12%), trimetoprim- sulfametoxazol (8%) y cloranfenicol (4%). Todas las cepas de *L. monocytogenes* fueron resistentes a ácido nalidíxico y la prevalencia de las resistencias fue en orden decreciente: ácido nalidíxico (70%), ciprofloxacino (9%), ceftriaxona (7%), tetraciclina (4%), vancomicina (4%), ampicilina (3%) y eritromicina (3%). La sensibilidad de las cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* a la mayoría de los antibióticos, concuerdan en algunos casos con las restricciones de su utilización en ganadería. Los resultados también mostraron que ambos patógenos presentaron resistencias a ácido nalidíxico, tetraciclina y en menor porcentaje a ampicilina y cefalotina. Además, se dieron 6 casos de multiresistencia: tres cepas de *Salmonella* spp. y tres cepas de *L. monocytogenes*. Este hecho, confirma la aparición de cepas resistentes a antibióticos utilizados habitualmente en clínica, lo que supone un problema de salud pública.

## Resum

El gènere *Salmonella* i *Listeria monocytogenes* son patògens que afecten a la salut de les persones i els animals, aquest fet produeix la necessitat de realitzar tractaments amb antibiòtics. L'inadequat ús es la principal causa de la resistència antimicrobiana, el que suposa un problema en el tractament clínic d'enfermetats. En aquest context, l'objectiu es avaluar la sensibilitat antimicrobiana de diferents cepes de *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes* aïllades de lactes, ovoproductes i peix. La resistència a antibiòtics es va avaluar segons el protocol del CLSI, amb 12 antimicrobians seleccionats per la seua importància en l'ús clínic. Els resultats de les cepes de *Salmonella* spp. mostraren que el percentatge de resistències varià segons l'orige de l'aïllat i es va obtenir que la prevalència en ordre decreixent: ampicilina (29%), àcid nalidíxico (21%), ceftriaxona (13%), amoxicilina- àcid clavulànic (13%), tetraciclina (12%), trimetoprim-sulfametoxazol (8%) i cloranfenicol (4%). *L. monocytogenes* mostrà que

totes aquestes foren resistents a l'àcid nalidíxic i la prevalència fou en ordre decreixent: àcid nalidíxic (70%), ciprofloxacino (9%), ceftriaxona (7%), tetraciclina (4%), vancomicina (4%), ampicilina (3%) y eritromicina (3%). La sensibilitat de les cepes de *Salmonella* i *L. monocytogenes* a la majoria dels antibiòtics, correspon en alguns casos amb les restriccions de la seua utilització en ramaderia. Els resultats també mostraren que els dos patògens presentaren resistències a l'àcid nalidíxic, tetraciclina i en menor percentatge a l'ampicilina i a la cefalotina. A més, es donaren 6 cassos de multirresistència: tres cepes de *Salmonella* spp. y tres cepes de *L. monocytogenes*. Aquest fet confirma l'aparició de cepes resistents als antibiòtics utilitzats habitualment en clínica, que suposa un problema de salut pública.

### **Abstract**

*Salmonella* gender and *Listeria monocytogenes* are pathogens that affect human and animal health, this fact produces the need of antibiotic treatment. The inappropriate use of antibiotics is the main cause of antimicrobial resistance, this means a problem in the clinic treatment of the illnesses. In this context, the aim is to evaluate the antimicrobial susceptibility of different strains of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products, egg products and fish. The resistance was evaluated according the CLSI, on 12 antimicrobials chose by importance in clinic use. *Salmonella* spp. results, showed that the percentage of resistance varied depending on the source of the strain and was obtained that the prevalence in decreasing order was ampicilin (29%), nalidixic acid (21%), ceftriaxone (13%), amoxiciline- clavulanic acid (13%), tetraciclín (12%), trimetroprim-sulfametoxazol (8%) y cloranfenicol (4%). *L. monocytogenes* showed that all of them were resistant to nadilixic acid and the prevalence in decreasing order was: nalidíxic acid (70%), ciprofloxacín (9%), ceftriaxon (7%), tetraciclín (4%), vancomicin (4%), ampicilin (3%) and eritromicin (3%). The *Salmonella* and *L. monocytogenes* susceptibility to the majority of antibiotics, concur with some restrictions used on farms. The results showed that both pathogens presented resistance to nadilixic acid, tetracycline and in lower percentage to ampiciline and cefalotine. Moreover, there were 6 multiresistances: three strains of *Salmonella* spp. and three strains of *L. monocytogenes*. This fact confirms the appearance of resistant strains to antibiotics normally used in clinic; which means a public health problem.

## 2. INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* posee alrededor de 2700 serotipos, que han sido encontrados en diferentes ambientes y hospedadores, y que causan salmonelosis. Esta enfermedad produce unos síntomas similares a los de una gripe o como fiebre entérica, gastroenteritis y septicemia. En casos de individuos inmunológicamente comprometidos, ancianos o niños puede causar la muerte si no se trata con antibióticos (Begum et al., 2010, Ait Melloul, 2001). *Salmonella* spp. es uno de los agentes bacterianos que más infecciones alimentarias causa en el mundo (Herikstad, et al. 2002). Como los animales productores de alimentos son reservorios de *Salmonella* spp., la transmisión de la enfermedad de los animales al ser humano se produce a través de la cadena alimentaria (Angulo et al., 2000). La mayoría de los brotes se han atribuido por de la ingesta de alimentos como huevos, carne, pescado, verduras frescas y leche sin pasteurizar (Begum et al., 2010).

*Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, capaz de originar listeriosis en humanos, causando entre otras afecciones: encefalitis, meningitis, septicemia, aborto y nacimiento prematuro. Afecta especialmente a individuos inmunológicamente comprometidos y a animales (mastitis, diarrea y gastroenteritis) (Seeliger y Jones, 1986, Herman et al., 1995; Vela et al., 2001; Siegman-Igra et al., 2002; McLauchlin et al., 2004; Aygun y Pehlivanlar, 2006; Harake et al., 2009). Este microorganismo oportunista es ubicuo en el medio ambiente, especialmente en material vegetal, suelo, forraje y agua. Otros reservorios incluyen animales domésticos y/o infectados. La principal vía de transmisión al hombre y a los animales, es a través del consumo de alimentos contaminados (Gandhi y Chikindas, 2007; White et al., 2002). Es importante destacar la capacidad de adaptación de *L. monocytogenes* a condiciones extremas como temperaturas entre 1 y 44°C, con valores de pH de 5.0 y superiores, en medios con altas concentraciones de sal y es relativamente resistente al secado y a la congelación (Lovett, 1989). Brotes y casos aislados de *Listeria monocytogenes* han sido asociados a diferentes tipos de alimentos contaminados, incluyendo repollo, leche, paté, queso fresco, carne y pescados (Schlech, 2000).

Ambos organismos están entre los principales causantes de muerte asociada a infecciones alimentarias en los países industrializados (EFSA, 2012). El número de casos confirmados de salmonelosis en 2010 en la Unión Europea fue de 112.524 y en España 4.424. El ratio de notificaciones de salmonelosis fue de 9,6 casos por cada 100.000 habitantes (OMS, 2013). La incidencia de los casos de salmonelosis ha aumentado significativamente en muchas áreas del mundo en las últimas décadas, particularmente desde 1980 (Meng y Doyle, 1998). En 2010 en la Unión Europea el número de casos confirmados de listeriosis fue de 1206 y el ratio de notificaciones de listeriosis fue de 0,35 casos por cada 100.000 habitantes. (OMS, 2013). En España, el número de casos confirmados de listeriosis en 2010 fue de 120 y el ratio de notificaciones de listeriosis fue de 0,26 casos por cada 100000 habitantes, inferior al ratio europeo, (OMS, 2013).

Según la EFSA ambas bacterias son consideradas como bacterias zoonóticas, que son aquellas que causan infecciones y enfermedades y son transmitidas de los animales al ser humano. Puede ser adquirida directamente de los animales, a través de la ingestión de alimentos

contaminados u otras vías de contacto indirecto. Las bacterias zoonóticas pueden desarrollar resistencia a antibióticos, principalmente por el uso de antibióticos a niveles subterapéuticos en ganadería (EFSA 2012, Korsak et al., 2012 y White, 1998). Los antimicrobianos son usados terapéuticamente en animales y humanos para controlar las infecciones bacterianas. Pueden ser incorporados a través de la alimentación al ganado y aves de corral a niveles subterapéuticos como promotores del crecimiento (Miranda et al., 2009). Desde enero de 2006 el uso de antimicrobianos como agentes promotores del crecimiento en ganadería ha sido prohibido en la UE con la finalidad de reducir el número de bacterias resistentes en animales de granja (Regulación (EC) No, 1831/2003). A pesar de su prohibición, en estudios de Korsak et al. (2012), han sido reconocidos fenotipos de resistencia a antimicrobianos entre múltiples patógenos zoonóticos, entre los que se encuentra *Salmonella* entérica y *Listeria monocytogenes* (White et al., 2002).

La resistencia a antibióticos, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es el fenómeno mediante el cual un organismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Los microorganismos resistentes (bacterias, virus y algunos parásitos) son inmunes a los efectos de los antimicrobianos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. El uso inadecuado e irracional de los antimicrobianos crea condiciones favorables a la aparición, propagación y persistencia de microorganismos resistentes, que surge por mutación del microorganismo o por la adquisición de genes de resistencia y consecuentemente la transmisión a los humanos como contaminante alimentario (OMS, 2012, EFSA 2008 a, EFSA 2008 b, EFSA 2012). En los últimos años, ha sido una importante preocupación a nivel mundial el incremento de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos, entre las que se encuentra *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, y que pueden ser transmitidas al ser humano a través de los alimentos (Busani, et al., 2004, Gales et al., 2002). Más de 25.000 pacientes en la Unión Europea mueren cada año por infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos. Y cada vez más se encuentran en los hospitales de la UE patógenos resistentes a los antibióticos. Lo que supone un problema que afecta a la inocuidad alimentaria y un riesgo directo sobre la seguridad alimentaria. Por ello, la Comisión Europea plantea la resistencia antimicrobiana como uno de los grandes desafíos dentro del marco de las políticas de salud, cambio demográfico y bienestar (European Commission, 2013).

En este contexto se plantea el presente trabajo, con el objetivo de evaluar la resistencia de diferentes cepas bacterianas de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* previamente aisladas de alimentos de diferentes orígenes: productos lácteos, pescados y ovoproductos.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. CEPAS BACTERIANAS**

Se utilizaron 26 cepas de *Salmonella* spp. y 49 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos de varios orígenes: lácteos y derivados, pescados y ovoproductos. Las cepas fueron proporcionadas por

el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, obtenidas de muestras del Control Oficial de los Productos Alimenticios en la Comunidad Valenciana entre los años 2007 y 2011 y utilizando los métodos UNE- EN ISO 6579:2003 para la detección de *Salmonella spp.* y los métodos UNE- EN ISO11290-1:1997, UNE- EN ISO11290-1:1997/A1:2005, UNE- EN ISO11290-2:2000, UNE- EN ISO11290-2:2000/A1:2005 para la detección de *Listeria monocytogenes*.

### 3.2. ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

#### 3.2.1. Antibiogramas. Método disco-placa

Para la realización de los antibiogramas se utilizó el método del antibiograma disco-placa del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que detalla el método para el estudio de las susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Se fundamenta en la difusión radial del antimicrobiano a través del agar, formándose un gradiente de concentración en la que, transcurrido el periodo de incubación (24h), se observa un halo de inhibición del crecimiento de la bacteria.

Existen, para cada antimicrobiano, unos diámetros de inhibición estandarizados (CLSI, 2012), expresados en mm. La lectura de los halos de inhibición se interpreta como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI, en referencia comparativa con una cepa control de calidad; para *Salmonella spp.* se utilizó *E.coli ATCC 25922* y para *L. monocytogenes* se utilizó *Enterococcus faecalis ATCC 33186*.

Los aislados que mostraron resistencia a tres o más agentes antimicrobianos fueron considerados como multirresistentes. Para la realización del estudio se ensayaron 12 antimicrobianos seleccionados, por su importancia en uso clínico, tras la realización de una búsqueda bibliográfica. Se utilizaron las recomendaciones de Cantón et al., (2007), entre otros.

Para las cepas de *Salmonella spp.* se estudió la sensibilidad a amikacina (AK, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), amoxicilina- ácido clavulánico (AMC, 20/10 µg), trimetoprim- sulfametoxazol (SXT, 1,25/23,75 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), ciprofloxacino (CIP, 5 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), gentamicina (CN 10 µg), ácido nalidíxico (NA, 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), cefalotina (KF, 30 µg) y kanamicina (K, 30 µg). Para las cepas de *Listeria monocytogenes* se evaluaron los mismos antibióticos excepto ceftriaxona y kanamicina en su lugar se utilizaron eritromicina (E, 15 µg) y vancomicina (VA, 5 µg); todos ellos de la marca comercial Oxoid.

#### 3.2.2. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se utilizó el método de gradiente antibiótico (E-test), un método cuantitativo muy similar a la técnica de difusión en disco, con el que se obtiene mediante lectura directa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se define CMI como la mínima concentración de antibiótico que en un determinado periodo de tiempo predeterminado es capaz de inducir la muerte in vitro del 99,9% de una población bacteriana que es la concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas.

Se determinó la CMI de aquellos antibióticos en las cepas que fueron resistentes o de sensibilidad intermedia, según el CLSI. Se utilizaron tiras con un gradiente de concentración (E-test, Biomérieux) para cada antibiótico: ampicilina (0,016- 256 µg/ml), amoxicilina-ácido clavulánico (0,016- 256 µg/ml), trimetroprim- sulfametoxazol (0,002- 32 µg/ml), ciprofloxacino (0,002- 32 µg/ml), cloranfenicol (0,016- 256 µg/ml), ácido nalidíxico (0,016- 256 µg/ml), tetraciclina (0,016- 256 µg/ml), cefalotina (0,016- 256 µg/ml), vancomicina (0,016- 256 µg/ml) y eritromicina (0,016- 256 µg/ml).

Además, para estudiar la disminución de sensibilidad a las quinolonas (Hakanen et al., 2005), en aquellas cepas que presentaron resistencia a ácido nalidíxico, se estudió la CMI a otras quinolonas como ofloxacino (0,002- 32 µg/ml) y levofloxacino (0,002- 32 µg/ml).

El control de calidad se hizo utilizando las mismas cepas de referencia que en el método disco-placa (CLSI, 2012).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA A SALMONELLA spp

#### 4.1.1. Resultados de los antibiogramas de *Salmonella* spp.

El porcentaje de cepas sensibles en *Salmonella* spp. osciló entre el 96,15% y el 73,07% (tabla 1). Se observó que el cloranfenicol seguido del trimetroprim- sulfametoxazol fueron los antibióticos a los que mayor porcentaje de cepas de *Salmonella* spp. fueron sensibles.

Tabla 1. Porcentaje de cepas sensibles de *Salmonella* spp. a cada antibiótico estudiado.

<i>Salmonella</i> spp.	
cloranfenicol C	96,2 %
trimetroprim- sulfametoxazol SXT	92,3 %
tetraciclina TE	88,5 %
cefalotina KF	88,5 %
amoxicilina- ácido clavulánico AMC	88,5 %
ácido nalidíxico NA	80,7 %
ampicilina AMP	73,1 %

La tabla 2 muestra los resultados del patrón de resistencias para las cepas de *Salmonella* spp. según su origen y número de cepas aisladas y entre paréntesis el porcentaje que supone con respecto al total de cepas de *Salmonella* spp. A la vista de los resultados, el patrón predominante fue la resistencia a ácido nalidíxico, que lo presentaron un 15,4% de las cepas de *Salmonella* spp. Además, el antibiótico que más se repitió entre los patrones de resistencia fue la ampicilina (AMP), presente en todos los orígenes estudiados (lácteos, pescados y ovoproductos), seguido de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), encontrado en lácteos y pescados. Se observa que en todos los orígenes *Salmonella* spp. presentó resistencia a antibióticos betalactámicos (AMP, AMC).

A partir de los resultados obtenidos, se puede decir, que el porcentaje de cepas de *Salmonella* spp. que presentaron resistencia a uno o más antibióticos varió en función de la procedencia de la cepa, siendo superior en las procedentes de pescado (75%), seguido de ovoproductos (55,6%) y productos lácteos (44,4%).

Tabla 2. Patrón de resistencia en las cepas estudiadas de *Salmonella* spp. para todos los orígenes. AMP: ampicilina, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, AMC: amoxicilina- ácido clavulánico, TE: tetraciclina, C: cloranfenicol, KF ceftriaxona, NA: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacino

ORIGEN	No (%)	Patrón de resistencia
Pescado n=8	2 (7,7)	AMP
	2 (7,7)	SXT
	1 (3,8)	AMP, AMC, TE, C
	1 (3,8)	AMP, AMC, TE, KF
Lácteo n=9	1 (3,8)	KF
	1 (3,8)	TE
	1 (3,8)	AMP, AMC, KF
	1 (3,8)	AMP, NA
Ovoproducto n=9	4 (15,4)	NA
	1 (3,8)	AMP

n: indica el número de cepas estudiadas.

Los resultados indican la existencia de tres cepas multirresistentes (resistentes a tres o más antibióticos) de *Samonella* spp., dos de ellas procedentes de pescado y otra cepa de origen lácteo. En sus patrones de resistencia se encuentra ampicilina (AMP), amoxicilina- ácido clavulánico (AMC) en los tres patrones de multirresistencia, tetraciclina (TE) y cefalotina (KF) en dos de ellos y cloranfenicol (C) en un patrón. El incremento de la resistencia a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol desde la década de los 80 puede atribuirse a la emergencia de multirresistencia en el serovar Typhimurium (Van Duijkeren et al., 2003, Threlfall, 2002). Este problema se agrava cuando la alimentación de los animales productores de alimentos contiene antibióticos, ya que se favorece la resistencia de *Salmonella* spp. a los antimicrobianos y su potencial transmisión al ser humano a través de la cadena alimentaria (Begum et al., 2010).

Se evaluó también la prevalencia de las resistencias en *Salmonella* spp. en función del antibiótico estudiado, figura 1. La prevalencia resultó ser heterogénea y los antibióticos que generaron más resistencia en *Salmonella* spp., en orden decreciente fueron ampicilina (29%) ácido nalidíxico (21%), cefalotina (13%), amoxicilina- ácido clavulánico (13%), tetraciclina (12%), trimetoprim- sulfametoxazol (8%) y cloranfenicol (4%).

La resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp. varía en función del alimento sobre el que se aísla la cepa y del país de origen (Busani et al., 2004, Bywater et al., 2004, Cetinkaya et al., 2008, Little et al., 2008, Miranda et al., 2009). Los resultados del presente estudio son menores que los obtenidos por Busani et al., (2004) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de alimentos en Italia con un 61% de cepas resistentes a ampicilina, un 17% a



cefalotina, un 4% a gentamicina, un 3% a kanamicina, 5% a amikacina, 11% a trimetoprim- sulfametoxazol, un 47% de resistencia a cloranfenicol, un 70% de cepas resistentes a tetraciclinas. En cambio, los resultados de dicho estudio fueron ligeramente inferiores para el ácido nalidíxico que presentó un 16% frente al 19,3% del presente estudio.

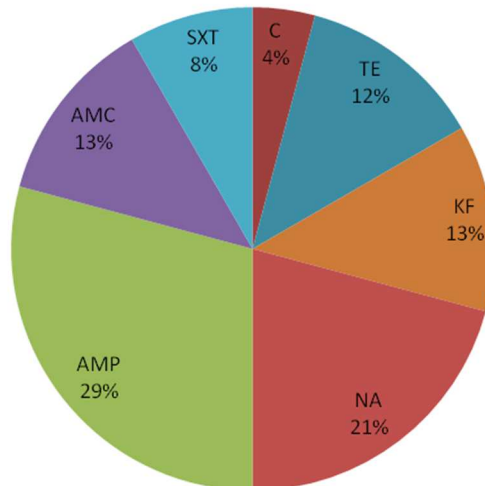


Figura 1. Prevalencia de las resistencias de *Salmonella* spp. en función del antibiótico ensayado.

Aunque alimentos como la carne son considerados de mayor riesgo de contaminación por *Salmonella* spp. que otros alimentos (Bryan, 1980, Escartin et al., 1999 y Jordan et al., 2006) los resultados evidenciaron que pescados, lácteos y ovoproductos también pueden ser una importante fuente de salmonelosis, como también obtiene en su estudio Miranda et al., 2009.

#### 4.1.1.1. Cepas de *Salmonella* spp. procedentes de pescado

De las ocho cepas de *Salmonella* spp. procedentes de pescado y alimentos de origen marino, sólo el 25% manifestaron sensibilidad a todos los antibióticos probados, y el 75% de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de productos marinos fueron resistentes a uno o más antibióticos.

El 50% de las cepas resistentes presentaron resistencia a ampicilina, el 25% a amoxicilina- ácido clavulánico, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol y el 12,5% presentaron resistencia a cloranfenicol y ceftriaxona. Se observó que el 12,5% de las cepas presentaron resistencia intermedia a ampicilina y no se observó resistencia intermedia a ningún otro antibiótico.

La prevalencia de las resistencias de las cepas de *Salmonella* spp. procedentes de pescados se muestran en la figura 2. Se obtuvo una prevalencia del 37% para ampicilina seguido, en orden decreciente por trimetoprim- sulfametoxazol (18%), amoxicilina- ácido clavulánico (18%), tetraciclina (18%) y cefalotina (9%).

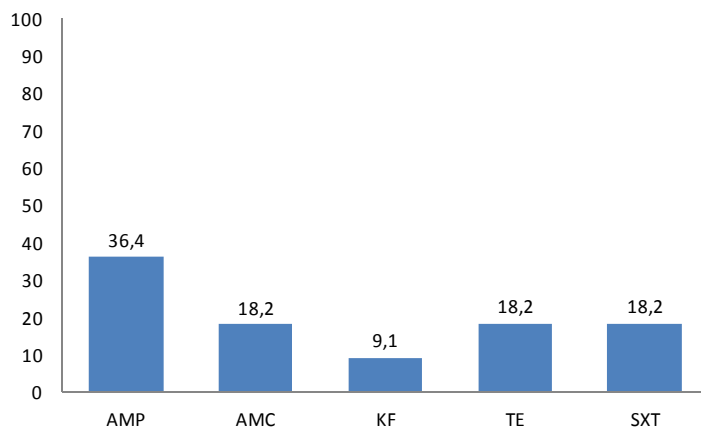


Figura 2. Prevalencia de las resistencias de *Salmonella* spp. procedentes de aislados en pescados.

#### 4.1.2. Cepas de *Salmonella* spp. procedentes de lácteos y derivados

De las 9 cepas de *Salmonella* spp. procedentes de alimentos lácteos y derivados, 4 de ellas manifestaron resistencia a uno o más antibióticos, lo que supone que el 44,4%, presentan resistencia y por consiguiente, el 55,6% de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de lácteos y derivados fueron sensibles a todos los antibióticos probados.

Los resultados muestran que todas las cepas de *Salmonella* spp. procedentes de alimentos lácteos y derivados fueron sensibles a ciprofloxacino, gentamicina, amikacina, kanamicina, ceftriaxona, cloranfenicol y trimetoprim- sulfametoxazol. Por otro lado, el 22,2% de las cepas manifestaron resistencia a ampicilina y a cefalotina, seguido del 11,1% de las cepas que presentaron resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico, a ácido nalidíxico y a tetraciclina. Resultados ligeramente superiores fueron los obtenidos por Miranda et al. (2009) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de productos lácteos con un 30% de las cepas resistentes a ampicilina y un 30% de cepas resistentes a cefalotina; muy superiores fue el porcentaje de cepas resistentes a tetraciclina con un 60% frente al 14,5% obtenido en el presente estudio.

La figura 3 muestra la prevalencia de las resistencias en las cepas de *Salmonella* spp. para cada antibiótico estudiado: la prevalencia de la resistencia a ampicilina (AMP) y a cefalotina (KF) fue de un 28,6%, y la prevalencia de la resistencia a ácido nalidíxico (NA) y a tetraciclina (TE) se obtuvo que fue de un 14,3%. Se observa que la resistencia a betalactámicos (AMP, AMC, KF) es la que presenta mayor número de cepas resistentes y tiene mayor prevalencia que la resistencia a otros antibióticos, esto puede asociarse a que el uso de esta familia de antibióticos está muy extendido en ganadería y se usa como aditivo en los piensos para el tratamiento clínico de la infección en vacuno. Su uso como promotores del crecimiento está prohibido desde 1975 (Buxadé, 1995).

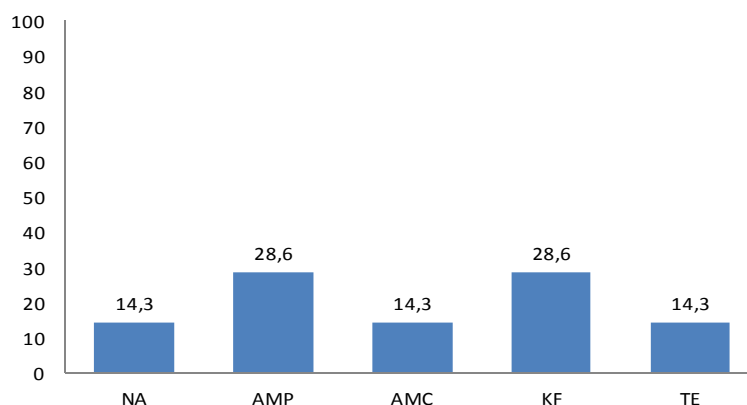


Figura 3. Prevalencia de las resistencias en las cepas de *Salmonella* spp. procedentes de aislados en productos lácteos.

#### 4.1.3. Cepas de *Salmonella* spp. procedentes de ovoproductos

Los resultados evidencian que el 44,4% de las cepas de *Salmonella* spp. procedentes de ovoproductos fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados. Cinco cepas presentaron resistencias, cuatro de ellas (44,4%) a ácido nalidíxico y una (11,1%) a ampicilina. La prevalencia de resistencias fue de 80% para el ácido nalidíxico y de un 20% para ampicilina. Resultados muy similares a los obtenidos por Begum et al., (2010) donde las cepas de *Salmonella* spp., aisladas de huevos solo presentaron resistencia a ácido nalidíxico y a ampicilina y fueron sensibles a ceftriaxona, cefalotina, tetraciclina, ciprofloxacino, gentamicina, cloranfenicol y kanamicina. La prevalencia de resistencias en el estudio de Begum et al., fue del 75% para ácido nalidíxico y del 25% para ampicilina, resultados muy similares a los obtenidos en el presente estudio.

#### 4.1.2. Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en cepas de *Salmonella* spp.

En aquellas cepas que presentaron resistencia o sensibilidad intermedia, a uno o más antibióticos, se estudió la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en  $\mu\text{g/mL}$ , como se muestra en la tabla 3. Los resultados del análisis de la CMI revelan que la resistencia es muy alta en el caso del ácido nalidíxico ya que todas las cepas que mostraron resistencia han dado la máxima CMI a este antibiótico (256  $\mu\text{g/mL}$ ), independientemente de que estas cepas sean resistentes a uno o a varios antibióticos. Seguido de la tetraciclina donde una cepa mostró la máxima CMI (256  $\mu\text{g/mL}$ ), aunque las otras dos cepas también mostraron una resistencia elevada (96  $\mu\text{g/mL}$  y 48  $\mu\text{g/mL}$ ).

Dos cepas procedentes de pescado (S0206 y S0211) presentaron una resistencia muy elevada a ampicilina y a amoxicilina- ácido clavulánico, con la máxima CMI, 256  $\mu\text{g/mL}$ . En este caso, coincidió que las cepas presentaron un mismo nivel de resistencia a dichos antibióticos. Esto resulta

lógico porque pertenecen al mismo grupo de antimicrobianos y por ello tienen características en común. También se detectaron resistencias bajas a estos antibióticos en cepas procedentes de pescado, lácteos y ovoproductos.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ ) de las cepas de *Salmonella* spp. procedentes de pescados, lácteos y ovoproductos que presentaron resistencia o susceptibilidad intermedia a uno o más antibióticos.

Cepa	Origen	AMP	AMC	SXT	CIP	C	NA	TE	KF	LV	OF
S0206	P	256	256			48		48			
S0107	P	1,0									
S0108	P	1,5									
S0610	P			32							
S0710	P			32							
S0211	P	256	256					256	4,0		
S0210	L								3,0		
S0310	L	1,5			0,25		256			0,38	0,75
S0309	L							96			
S0110	L	2,0	2,0						2,0		
S0209	O				0,19		256			0,25	0,75
S0410	O	1,5									
S0311	O				0,19		256			0,25	0,75
S0411	O				0,19		256			0,38	0,5
S0412	O				0,19		256			0,25	0,5

Las letras P, L y O indican, pescados, lácteos y ovoproductos, respectivamente. Los colores indican el grado de susceptibilidad de la cepa al antibiótico: verde cepas sensibles, amarillo resistencia baja, y rojo las que presentan un nivel de resistencia alto (CLSI).

Las resistencias a trimetoprim- sulfametoxazol y a cloranfenicol fueron altas según la clasificación del CLSI, de 32 y 48  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Las cepas que presentaron resistencia a ciprofloxacino, levofloxacino y ofloxacino lo hicieron con un nivel bajo, con una CMI entre 0,19 y 0,75  $\mu\text{g/mL}$ . La CMI de ciprofloxacino y de cefalotina en todos los casos fue baja oscilando entre 0,19 y 4  $\mu\text{g/mL}$ . Se observó que aquellas cepas que fueron resistentes sólo a un antibiótico, su CMI fue baja; como ocurre en el caso de las cepas S0107, S0108, S0410 que tienen una CMI de 1,5  $\mu\text{g/mL}$  para ampicilina.

Los resultados de CMI muestran que aquellas cepas que son multirresistentes y aquellas que son resistentes a varios antibióticos presentan una CMI alta (según el CLSI), como en el caso de la S0206 y la S0211, ambas multirresistentes y aisladas de pescados; estas cepas podrían considerarse como cepas de alto riesgo y muy peligrosas por ser muy resistentes a varios antibióticos. Además, estudios de otros autores señalan que desde la década de los ochenta y principios de los noventa ha ido aumentando la multirresistencia a antibióticos en *Salmonella* spp. en el mundo (Lee et al., 1994 y Threlfall et al., 1993)

Las cepas que presentaron resistencia a ácido nalidíxico manifestaron una resistencia muy alta a éste, y baja o sensibilidad reducida a otras fluorquinolonas como el ciprofloxacino, el levofloxacino y el ofloxacino. Esto

puede deberse a la emergencia de nuevas cepas de *Salmonella* spp. que son resistentes al ácido nalidíxico y muestran una sensibilidad reducida a fluorquinolonas (Hakanen et al., 2005). Hakanen et al., (1999) sugirió que la resistencia a ácido nalidíxico puede indicar un nivel bajo de resistencia a ciprofloxacino. Con el presente estudio se observó que las cepas que presentaron resistencia a ácido nalidíxico fueron aisladas de lácteos y ovoproductos; es posible que entraran a la cadena alimentaria a partir del nicho ecológico procedente de la ganadería (vacuno y avicultura). Se comprobó que existe reducción de la sensibilidad a fluorquinolonas, ya que aquellas cepas que mostraron resistencia a ácido nalidíxico también presentaron resistencia a otras fluorquinolonas como: ciprofloxacino, levofloxacino y ofloxacino. El incremento del descenso de la sensibilidad a ciprofloxacino en *Salmonella* spp. puede deberse a que ciprofloxacino es el antibiótico de primera elección en el tratamiento de la infección en clínica y por el uso de antibióticos de la familia de las fluorquinolonas en avicultura desde 1993 (Threlfall, 2002).

Se ha observado que en los últimos años ha aumentado la resistencia de *Salmonella* spp. a los antimicrobianos. En un estudio realizado en España, Prats et al. (2000), revela que la resistencia de *Salmonella* spp. a ampicilina incrementó del 8 al 44%, la resistencia a tetraciclina del 1 al 42%, la resistencia a cloranfenicol del 1,7 al 26% y la resistencia a ácido nalidíxico del 0,1 al 11% en un intervalo de tiempo entre 7 y 10 años.

#### 4.1. SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA A *LISTERIA MONOCYTOGENES*

##### 4.1.1. Resultados de los antibiogramas de *Listeria monocytogenes*

El porcentaje de cepas sensibles de *Listeria monocytogenes* osciló entre el 99,87% y el 73,47% (a excepción del ácido nalidíxico). Se obtuvo que todas las cepas de *L. monocytogenes*, a excepción de una de ellas, que era de resistencia intermedia, manifestaron resistencia a ácido nalidíxico. Los mayores porcentajes de cepas sensibles fueron a ampicilina, seguido de eritromicina y tetraciclina, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de cepas sensibles de *Listeria monocytogenes* a cada antibiótico estudiado.

<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	
ampicilina AMP	99,9 %
eritromicina E	95,9 %
tetraciclina TE	93,9 %
ciprofloxacino CIP	87,8 %
ceftriaxona KF	75,5 %
vancomicina VA	73,5 %
ácido nalidíxico NA	0,0 %

En la tabla 5 se presenta el patrón de resistencias de las cepas de *Listeria monocytogenes* según el origen del aislado y el porcentaje que supone con respecto al total de cepas de *L. monocytogenes*.

Se obtuvo que el patrón de resistencia predominante entre las cepas de *L. monocytogenes* procedentes de los distintos orígenes fue la resistencia al ácido nalidíxico, que lo presentaron un 64% de las cepas, (44% pescado; 20% de productos lácteos). Además en los alimentos de origen lácteo se ha obtenido que tres cepas son multirresistentes, dos de ellas a cuatro antimicrobianos y una a cinco, con resistencias a ácido nalidíxico, tetraciclina, ceftriaxona, vancomicina y eritromicina. En otro estudio realizado por Conter et al. (2009) se obtuvieron resultados similares, donde lo que predomina *L. monocytogenes* es la resistencia a un solo antibiótico y además en su estudio, igual que en el presente, se detectó un aislado multirresistente con resistencia a 5 antibióticos (ciprofloxacino, moxifloxacino, linezolid, vancomicina y trimetoprim- sulfametoxazol).

Tabla 5. Patrón de resistencia en las cepas estudiadas de *Listeria monocytogenes*. NA: ácido nalidíxico, KF: ceftriaxona, AMP: ampicilina, VA: vancomicina, CIP: ciprofloxacino, E: eritromicina, TE: tetraciclina.

ORIGEN	No (%)	patrón de resistencia
Pescado n=25	22 (44)	NA
	2 (4)	NA, KF
	1 (2)	NA, AMP
Lácteos n=21	10 (20)	NA
	1 (2)	VA
	6 (12)	NA, CIP
	1 (2)	NA, AMP,
	1(2)	NA, E, TE, KF
	1 (2)	NA, TE, KF, VA
	1 (2)	NA, E, TE, KF, VA
Vegetal n=2	2 (4)	NA
Comida preparada n=1	1 (2)	NA
Horchata n=1	1 (2)	NA

n: indica el número de cepas estudiadas.

Se evaluó también la prevalencia de las resistencias en *L. monocytogenes* procedentes de pescado, lácteos y ovoproductos, en función del antibiótico; los resultados indicaron que la prevalencia fue mayor para ácido nalidíxico (70%), seguido de ciprofloxacino (9%), cefalotina (7%), tetraciclina (4%), vancomicina (4%), ampicilina (3%) y eritromicina (3%) (figura 4).

La prevalencia de las resistencias de *L. monocytogenes* a los antibióticos de primera elección para el tratamiento de listeriosis resultó ser generalmente baja; siendo un 3% y 4% para ampicilina, vancomicina, y eritromicina (véase figura 5) y nula para gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Esto resulta ser positivo a la hora de combatir la listeriosis, ya que la ampicilina y gentamicina se usan como tratamiento de primera elección de listeriosis y trimetoprim- sulfametoxazol se usa como terapia de segunda elección. Vancomicina y eritromicina se usan para el tratamiento de listeriosis en mujeres embarazadas, (Charpentier y Courvalin, 1999)

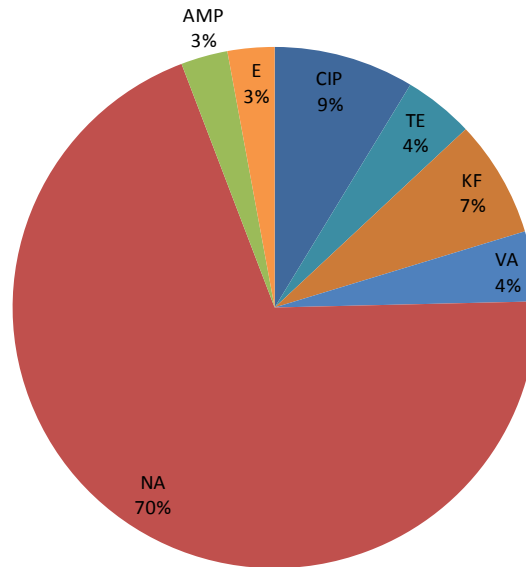


Figura 4. Prevalencia de las resistencias en *Listeria monocytogenes* en función del antibiótico.

#### 4.1.1.1. Cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de pescado

Se estudiaron 25 cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de pescados y alimentos de origen marino. Se observó que todas las cepas fueron sensibles a ciprofloxacino, gentamicina, amikacina, amoxicilina- ácido clavulánico, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim- sulfametoxazol y eritromicina. Todas las cepas fueron resistentes a nalidíxico, dos cepas presentaron resistencia a ceftriaxona (8%) y una a ampicilina (4%). Además, algunas cepas manifestaron resistencia intermedia: dos cepas a ampicilina (8%), siete cepas a ceftriaxona (28%) y cuatro cepas a vancomicina (16%).

#### 4.1.1.2. Cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de lácteos y derivados

Se estudiaron 21 cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de alimentos lácteos y derivados. El 100% presentaron resistencia a uno o más antibióticos. Un 33,3% de las cepas presentaron resistencia intermedia a vancomicina, 28,57% a cefalotina y un 4,76% a ampicilina y a ácido nalidíxico.

Además, se comprobó que el 95,24% de las cepas de *L. monocytogenes* procedentes de productos lácteos y derivados fueron resistentes a ácido nalidíxico, seguido del 14,29% de las cepas que presentaron resistencia a tetraciclina, cefalotina y a vancomicina. El 9,52% de las cepas presentaron resistencia a eritromicina y el 4,76% a ampicilina.

Los resultados mostraron que todas las cepas estudiadas fueron sensibles a gentamicina, amikacina, amoxicilina- ácido clavulánico, cloranfenicol y trimetoprim- sulfametoxazol. Similares resultados fueron los obtenidos por Harakek et al, (2009) en los que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas en productos lácteos, fueron sensibles a gentamicina (93,34%) y trimetoprim- sulfametoxazol (83,33%). Esta sensibilidad puede deberse al hecho de que estos antibióticos están

prohibidos para el tratamiento antimicrobiano en veterinaria o como promotores del crecimiento (Klein et al., 1998).

Harakek et al, (2009), obtuvo valores de resistencia más bajos, 20% de cepas resistentes a tetraciclina y 26,66% de cepas resistentes a vancomicina, frente al obtenido en el presente estudio de 14,29%.

Muchas bacterias Gram positivas son sensibles a antibióticos glicopéptidos entre los que se encuentra la vancomicina. La resistencia a este componente es una propiedad intrínseca de algunos patógenos humanos (Marco et al.,1998). El 14,29% de las cepas mostraron resistencia a vancomicina, este valor puede considerarse alto al compararlo con el obtenido por Conter et al. (2009) donde solo el 0,8% de las cepas mostraron resistencia a vancomicina.

Tabla 6. Prevalencia (en porcentaje) de las resistencias y de las susceptibilidades intermedias para cada antibiótico, en las cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de productos lácteos y derivados.

Antibiótico	Resistencias (%)	Intermedia (%)
NA	52,8	10,0
CIP	16,7	0,0
TE	8,3	0,0
VA	8,3	20,0
KF	5,6	60,0
E	5,6	0,0
AMP	2,8	10,0

Se obtuvo que todas las cepas fueron sensibles a gentamicina, amikacina, amoxicilina- ácido clavulánico, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol. La prevalencia de la resistencia de las cepas aisladas de alimentos lácteos y derivados es de un 14%, seguido de la susceptibilidad intermedia con un 4%; la prevalencia de la sensibilidad es de un 82%.

La prevalencia de las resistencias y de las susceptibilidades intermedias en las cepas de *L. monocytogenes* por antibiótico se presentan en la tabla 6. Destaca que la mayor prevalencia de la resistencia se debe a ácido nalidíxico (51%), seguido de, por orden decreciente, ciprofloxacino (16%), tetraciclina (8%), cefalotina (8%), vancomicina (8%), eritromicina (6%) y ampicilina (3%).

#### 4.1.2. Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en cepas de *Listeria monocytogenes*

En aquellas cepas que presentaron resistencia o sensibilidad intermedia, a uno o más antibióticos se estudió la Concentración Mínima Inhibitoria, (CIM) en µg/mL. La CMI permite cuantificar el nivel de resistencia de la cepa a dicho antibiótico. La tabla 7 se presenta la CMI de los antibióticos en las cepas de *Listeria monocytogenes* que presentaron resistencia o sensibilidad intermedia.



Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ ) de las cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de pescados, lácteos y ovoproductos que presentaron resistencia o susceptibilidad intermedia a uno o más antibióticos.

Cepa	Origen	AMP	E	CIP	NA	TE	KF	VA	LV	OF
L0106	P			0,5	256				0,38	1,5
L0206	P			0,5	256				0,38	1,5
L0306	P			0,75	256				0,5	1,5
L0406	P			0,75	256				0,5	2,0
L0506	P			0,5	256				0,75	1,5
L0606	P			0,5	256				0,38	1,5
L0706	P			0,5	256				0,5	1,5
L0107	P			0,75	256		1,0		0,5	1,5
L0407	P	0,094		1,0	256				0,5	1,5
L0507	P	0,19		0,38	256		1,0		0,38	2,0
L0109	P			0,75	256		1,5		1,0	2,0
L0209	P			0,75	256				0,75	2,0
L1009	P			0,75	256				0,5	2,0
L1109	P			0,5	256				0,5	1,5
L1209	P			0,75	256				0,5	1,5
L1309	P			0,75	256				0,38	1,5
L1409	P			0,75	256				0,5	1,5
L2009	P			0,75	256			1,50	0,5	1,5
L2109	P			0,75	256			1,50	0,38	1,5
L2209	P			0,75	256				0,5	2,0
L2309	P			0,50	256				0,5	1,5
L2409	P			0,50	256				0,38	1,5
L2509	P			0,75	256				0,5	1,5
L0110	P			0,75	256			1,50	0,5	1,5
L0111	P			0,50	256			2,00	0,5	1,5
L0207	L			0,50	256				0,5	2,0
L0307	L			0,75	256				0,5	1,5
L0707	L			0,75	256				0,5	1,5
L0108	L			0,75	256				0,5	1,5
L0309	L			8,0	256		1,5		1,0	4,0
L0409	L			4,0	256		0,75		0,75	3,0
L0509	L			3,0	256		1,0		1,0	4,0
L0609	L			6,0	256		1,0		1,0	4,0
L0709	L			6,0	256				0,75	3,0
L0809	L			6,0	256		1,5		1,0	3,0
L0909	L			0,25	256		1,0		0,38	1,0
L1509	L			0,75	256				0,5	2,0
L1609	L		256	1,0	256	128		4,00	0,5	3,0
L1709	L			1,0	256	96	16,0	1,5	0,5	1,5
L1809	L		1,0	1,0	256	96		1,5	0,5	1,5
L0210	L			0,75	256			3,0	0,5	1,5
L0310	L			0,75	256			2,0	0,5	1,0
L0410	L			0,75	256			2,0	0,5	2,0
L0510	L			0,75	256			2,0	0,38	1,5
L0610	L			0,75	256			1,0	0,38	1,5
L1909	V			0,75	256				0,5	2,0
L0607	V			0,75	256				0,5	1,5
L0806	H			0,5	256				0,5	1,0
L0112	CP			0,75	256			2,0	0,5	1,0

Las letras P, L y O indican el origen de la cepa (pescado, lácteo y ovoproducto respectivamente). Los colores indican el grado de susceptibilidad al antibiótico; verde sensibles, amarillo las que tras la realización del e-test se obtuvo que son de resistencia baja, naranja de resistencia intermedia y en rojo las que presentan un nivel de resistencia alto (CLSI).

Se comprobó que la resistencia al ácido nalidíxico es muy alta en todas las cepas de *L. monocytogenes*, ya que todas las cepas han dado la máxima CMI a este antibiótico (256 µg/mL), independientemente de que estas sean resistentes a uno o a varios antibióticos. Seguido del ácido nalidíxico, se observó que la resistencia a tetraciclina es muy alta en todas las cepas que presentaron resistencia, pues el 75% mostraron la máxima resistencia, CMI 256 µg/mL, el 8,3% presentaron una CMI de 128 µg/mL y el 16% una CMI de 96 µg/mL. Estas cepas fueron aisladas de productos lácteos y vegetales. Se obtuvo que una cepa procedente de un producto lácteo presentó resistencia alta a eritromicina, CMI 256 µg/mL.

En cuanto a la resistencia a ciprofloxacino, se obtuvieron 5 cepas con resistencia alta, con valores de CMI entre 4 y 8 µg/mL, el resto de las cepas manifestaron una resistencia baja. Se comprobó que todas las cepas que fueron resistentes a ácido nalidíxico presentaron susceptibilidad reducida a ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, del mismo modo a lo observado entre las cepas de *Salmonella* spp. Se observó que existe una correspondencia entre las cepas que manifestaron resistencia alta a ciprofloxacino, también presentan una resistencia un poco más elevada a ofloxacino y levofloxacino que el resto de cepas, pero no se ha encontrado bibliografía acerca de este fenómeno en *L. monocytogenes*. Se obtuvo que la resistencia a cefalotina fue baja en todos los casos (CMI entre 0,75 µg/mL y 1,5 µg/mL) excepto en un caso, la cepa L1709, que presentó una resistencia intermedia, con CMI= 16 µg/mL. Solo dos cepas de *L. monocytogenes* presentaron resistencia a ampicilina, que fue baja ya que tienen una CMI de 0,094 µg/mL y de 0,19 µg/mL.

Las cepas que son multirresistentes L1609, L1709 y L1809 presentaron una CMI alta para ácido nalidíxico y tetraciclina, una de ellas presentó resistencia alta para eritromicina y otra intermedia para este mismo antibiótico, otra de estas cepas presentó resistencia intermedia para ceftriaxona y el resto resistencia baja, tal como se muestra en la tabla 7.

Del análisis de la sensibilidad a las quinolonas se obtuvieron nuevas cepas multirresistentes, que presentan resistencia baja e intermedia a ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino. Estas cepas multirresistentes podrían considerarse como cepas de alto riesgo y muy peligrosas por ser muy resistentes a varios antibióticos de grupos de importancia clínica.

## 5. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha permitido comprobar que aproximadamente el treinta por cien de las cepas de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* procedentes de pescado, lácteos y ovoproductos, analizadas en control oficial, han sido resistentes a uno o más antibióticos.

El ácido nalidíxico ha sido para ambas bacterias, el antibiótico con mayor porcentaje de cepas resistentes, que puede indicar un aumento en la resistencia a otras fluorquinolonas. Por otra parte, la CMI ha confirmado la reducción de la sensibilidad a fluorquinolonas en aquellas cepas que son resistentes a ácido nalidíxico, lo que puede suponer un problema para la elección del antibiótico en tratamientos clínicos.

La presencia de multiresistencias se ha confirmado en ambas bacterias. En particular, *Salmonella* spp. presentó resistencia a dos o más antibióticos

en dos cepas procedentes de pescado y una de lácteos y *Listeria monocytogenes* en tres cepas aisladas en producto lácteos.

Los resultados obtenidos demuestran que la presencia de cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* resistentes a determinados antibióticos es una realidad que llega al consumidor. Por otra parte, se puede observar un aumento de la sensibilidad a algunos antibióticos, como la ceftriaxona, con restricciones en su utilización en ganadería. Lo que pone en evidencia la necesidad de seguir tomando medidas en el sector primario para minimizar las consecuencias clínicas y mejorar la efectividad de los tratamientos en humanos.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su apoyo al Área de Seguridad Alimentaria de la Dirección General de Salud Pública de la Conserjería de Sanidad de la Generalitat Valenciana por su colaboración. Sin embargo las opiniones expresadas en este trabajo no necesariamente reflejan la posición o la política de la Consejería de Sanidad.

## 7. REFERENCIAS

- Ait Melloul, A., Hassani, L., y Rafouk, L. 2001. Salmonella contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17:207-209.
- Angulo, F.J., Johnson K.R., Tauxe R.V., Cohen M.L. 2000. Origins and consequences of antimicrobial resistant nontyphoidal Salmonella: implications for the use of fluorquinolones in food animals. *Microb Drug Resist.* 6:77-83.
- Begum, K., Ahmed Reza, T., Haque, M., Hossain, A., Kabirul F.M., Naid, S., Akhter, N., Ahmed, A., Barua, U. 2010. Isolation, identification and antibiotic resistance pattern of Salmonella Spp. from chicken eggs, intestines and environmental samples. *Bangladesh Pharmaceutical Journal.* Vol. 13, No 1. 23-27.
- Bryan, F.L. 1980. Foodborne disease in the United States associated with meat and poultry. *J. Food. Prot* 43:140-150.
- Busani, L., Graziani, C., Battisti, A., Franco, A., Ricci, A., Vio, D., Didiannatale, E., Luzzi, I. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimorium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiol. Infect* 132:245-251.2004.
- Buxadé Carbó, C. Alimentos y racionamiento. *Zootecnia. Bases de la producción animal.* Editorial Mundi- prensa. 1995.
- Bywater, R., Deluker, H., Deroover, E., De Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shryock, T., Shuster, D., Thomas, V., Vallé, M., Walters, A.A. 2004. European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:744-754
- Cantón, R., Alós, J.I., Baquero, F., Calvo, J., Campos, J., Castillo, J., Cercenado, E., Domínguez, M<sup>a</sup>., Liñares, J., López-Cerezo, L., Marco, F., Mirelis, B., Morosini, M.I., Navarro, F., Oliver, A., Pérez-Trallero, E., Torres, C., y Martínez-Martínez, L. en representación del Grupo de Consenso de Recomendaciones para la selección de Antimicrobianos y Concentraciones en el Estudio de la Sensibilidad in vitro con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. 2007. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad in vitro con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 25 (6): 394-400.
- Charpentier, E., Courvalin, P., 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 43: 2103-2108.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard- Eleventh Edition.* CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory standards Institute; 2012.
- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Ianieri, A. 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology.* 128: 497-500.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2010. *EFSA Journal* 10, 2597.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008a. Draft Opinion on Antimicrobial Resistance in Food.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008b. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the Health and Consumer Protection. Directorate General, European Commission on Microbiological Risk Assessment in feedingstuffs for food producing animals. *The EFSA Journal* (2008) 720, 1-84.
- EFSA European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2012; The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. *EFSA Journal* 2012; 10(3):2598.[233 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2598. Available online:
- Escartin, E.F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A., Saldaña-Lozano, J. 1999. Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. *Food Microbiol.* 16:479-486.
- European Commission, 2003. Regulation (EC) No, 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, *Official Journal of the European Union* L268, 29-40.

- European Commission. Horizon 2020. The Framework Programme for Research and Innovation. EU Research and Innovation: Tackling Societal Challenges. European Union. 2013.  
[http://ec.europa.eu/research/horizon2020/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/research/horizon2020/index_en.cfm)
- Gales, A. C., Sader, H. S., Mendes, R.E., Jones, R.N. 2002. *Salmonella spp.* isolates causing bloodstream infections in Latin America: report of antimicrobial activity from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44:313-318.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, 1-15.
- García, J.A., Cantón R., García J., Gómez-Luis M<sup>L</sup>., Martínez, L., Rodríguez-Avial, C., Vila, J. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 11.
- Hakanen, A.J., Lindgren, M., Huovinen, P., Jalava, J., Siitonen, A., Kotilainen, P. new quinolone resistance phenomenon in salmonella entérica: Nadilixic Acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. *Journal of clinical microbiology.*(5775-5778). 2005.
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, N. 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy- based food products. *Science of total environment* 407. 4022-4027.
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R.V. 2002. *Salmonella surveillance*: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129:1-8.
- Herman L., De Block J., Moermans R. 1995. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by two-step PRC with nested primers. *Appl Environ Microbiol.* 61: 817-9
- Jordan, E., Egan, J., Dullea, J., Ward, K., McGillicuddy, K., Murray, G., Murphy, A., Bradshaw, B., Leonards, N., Rafter, P., McDowell, S. 2006. *Salmonella* surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004. *Int. J. Food Microbiol.* 12:66-70.
- Klein, G., Pack, A., Reuter, G. 1988. Antibiotic resistance patterns of *enterococci* and occurrence of vancomycin-resistant *enterococci* in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol.* 64: 1825-1830.
- Korsak D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A., Pappelbaum, K. 2012 Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 158. 203-208.
- Lovett, J. 1989. *Listeria monocytogenes*. In M.P. Doyle (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens* (pp. 283-310). Marcel Dekker.
- Marco, I., Giuliana, L.C., Roberta, F. 1998. *van A* gene cluster in vancomycin-resistant clinical isolate of *bacillus circulans*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy.* 42 (8): 2055-2059.
- Mc Lauchlin, J., Mitchell R., Smerdon, W., Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J food Microbiol.* 92: 15-33.
- Meng, J. y Doyle M.P. 1998. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bull. Inst. Pasteur*, 96, 151-164.
- Miranda, J.M., Mondragón A. C., Martínez, B., Guardon, M., Rodríguez, J.A. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of food protection*, Vol 72, No 5, (966-971) 2009.
- Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Fente, C.A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A., Franco, C.M. 2008. Evolution of resistance of poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poult. Sci.* 87.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N° 194. Marzo de 2012.
- Prats, G., Mirelis, B., Llovet, T., Muñoz, C., Miró, E., Navarro, F. 2000. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44. 1140-1145.
- Phillips, I., Casewell, M. Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. 2003. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:28-52.
- R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli. 2006. Método de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de bacteriología y virología médica.* (663-671).
- Sabaté, M., Prats, G., Moreno, E., Ballesté, E., Blanch, A.R., Andreu, A. 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res. Microbiol.* 159:288-293.
- Schlech, W.F. 2000. Foodborne listeriosis. *Clinical Infections Diseases*, 31, 770-775.
- Seeliger, H.P.R. and Jones, D. 1986. Genus *Listeria*. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, and M. E. Sharpe (Eds.), *Berge's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 1235-1245). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Siegmán-Igra, Y., Levin, R., Weinberger, M., Golan, Y., Schwartz, D., Samra, Z., et al. (2002). *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerging Infections Disease*, 8, 305-310.
- Threlfall, E.J., Rowe, B., Ward, L.R. 1994. A comparison of multiple drug resistance in salmonellas from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. *Epidemiol. Infect.* 111: 189-197.
- Threlfall, E.J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews.* 26: 141-148
- Van Duijkeren, E., Wannet, W.J.B., Houwers, D., Pelt, W. 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.* Aug: 3574-78.
- Vela, A.I., Fernandez-Garayzabal, J.F., Latre, M.V., Rodriguez, A.A., Dominguez, L., Moreno, M.A. 2001. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(3), 215-220.
- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D. D., McDermott, P.F., 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and infection* 4, 405-412.
- White, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279:996-997. 1988.