



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES.

**DETERMINACIÓN DE LA
SUSCEPTIBILIDAD A
ANTIBIÓTICOS Y BIOCIDAS DE
CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
AISLADAS DE SUPERFICIES
DE UN MATADERO.**

Alumno/a: Cristina Martos Bermúdez.

Jaén. Junio 2017

INDICE.

RESUMEN/ ABSTRACT.	3
1. INTRODUCCION.	4
1.1 Bacterias patógenas presentes en un matadero.....	4
1.1.1 Escherichia coli	6
1.2 Resistencia a antibióticos	8
1.3 Resistencia a biocidas	13
1.4 Medidas para frenar la diseminación de la resistencia en la cadena alimentaria.	15
2. OBJETIVOS.	16
3. MATERIAL Y METODOS.....	16
3.1 Bacterias.	16
3.2 Medios de cultivo.	18
3.3 Agentes microbianos.	18
3.3.1 Antibióticos.	18
3.3.2 Biocidas.	20
3.4 Determinación de la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos.	21
4. RESULTADOS.	21
4.1 Susceptibilidad a antibioticos	22
4.1.1 Ampicilina.	22
4.1.2 Ciprofloxacino	25

4.1.3. Tetraciclina	27
4.1.4. Cloranfenicol	28
4.1.5. Eritromicina.....	30
4.2. Susceptibilidad a biocidas	31
4.2.1. Clorhexidina.....	31
4.2.2. Cloruro de benzalconio.....	33
4.3. Selección de cepas resistentes a antibióticos y biocidas.....	34
5. DISCUSIÓN.....	35
6. CONCLUSIÓN.....	36
7. BIBLIOGRAFIA.....	36

RESUMEN/ ABSTRACT

[ES] Los antibióticos son sustancias que tienen la capacidad no solo para tratar las infecciones bacterianas en humanos, sino también en animales. Los biocidas son agentes microbianos químicos que contienen una o más sustancias activas, cuyo objetivo es destruir, neutralizar e impedir la acción de microorganismos y así ejercer un control sobre la propagación de enfermedades infecciosas.

La resistencia a estos tratamientos surge con el mal uso de estos agentes y su excesivo uso. Los microorganismos desarrollan mecanismos de resistencia para asegurar su supervivencia. En esta memoria, se determinó la susceptibilidad a antibióticos y biocidas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de superficies de un matadero. Los resultados obtenidos determinaron una mayor resistencia a los biocidas que a los antibióticos

[EN]Antibiotics are substances that have the capacity not only to treat the bacterial infections in humans, but also in animals. Biocides are chemical microbial agents that contain one or more active substances or organisms, whose aim is to destroy, neutralize and prevent the action of microorganisms and thus exert a control on the spread of infectious diseases.

The resistance to these treatments arises with the misuse of these agents and their excessive use. The microorganisms develop mechanisms of resistance to ensure their survival. In this report, we determined the susceptibility to antibiotics and biocides in *Escherichia coli* strains isolated from surfaces of a slaughterhouse. The results obtained were determined a higher resistance to biocides than to antibiotics.

1. INTRODUCCION

1.1 Bacterias patógenas presentes en un matadero

En la industria cárnica, se realizan varias actividades como son el sacrificio de los animales en los mataderos, el despiece y posterior trabajo en las cadenas de elaboración de estos productos. Al tratarse de la transformación de una o varias clases de ganado en pedazos más pequeños para el consumo, debe de haber un sistema de higiene en todas las etapas de la producción. Un control que se lleva a cabo a causa de la susceptibilidad de la carne a ser contaminada microbiológicamente por el aire, los trabajadores, el equipo, etc., debido al trabajo en atmósferas cálidas y húmedas o contaminadas. Para ello hay un control exhaustivo de los tiempos en los que se mantiene la carne en las cámaras para garantizar una temperatura óptima de conservación. Durante todo el proceso se mantienen los canales a una temperatura en torno a los 10°C, para así controlar varios parámetros microbiológicos. Se emplea un sistema de anestesia por CO₂, en condiciones de temperatura y presión indicadas como las mejores condiciones para el tratamiento de la carne (González Fernández et al., 2010).

Los estudios anteriormente realizados, analizaron la patogenicidad de bacterias de la especie *Escherichia coli* en mataderos. En el matadero, se examinan

muestras rectales de los animales y muestras de trozos de carne, así como la superficie donde han ido pasando los trozos de carne de los animales sacrificados. En estos estudios se ensayó el contenido del plásmido de toxicidad y el tipo de fago (Atnafie et al., 2017). Durante el trabajo en un matadero hay que tener en cuenta la exposición a los agentes biológicos (AB), ya que se mantiene contacto tanto con el animal como después con la maquinaria utilizada y el producto animal.

Los AB son seres vivos que si penetran en el organismo humano pueden provocar enfermedades infecciosas o parasitarias. Según sus características, se clasifican en cinco grupos principales: virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos o gusanos.

Por motivos de higiene, en los mataderos se utiliza gran cantidad de agua para el procesamiento, generando así gran cantidad de aguas residuales, al aumentar el número de maquinaria y túneles para el procesamiento y la incorporación del lavado de piezas en cada etapa, hace que se encuentren bastantes tipos de bacterias fermentativas. En la planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) en el proceso de tratamiento de la carne, se detecta *E. coli* (STEC) y un porcentaje de *E. coli* patógena que puede tener repercusión en cualquier zona de tratado cárnico (Diallo et al., 2013).

Con el avance de las técnicas en biología molecular, ha aumentado la comprensión de la identidad de los microorganismos específicos que se encuentran implicados en el tratamiento de aguas residuales. Estos estudios se centraron en las poblaciones microbianas, la diversidad y la evolución de las especies bacterianas que intervienen en el tratamiento de las aguas residuales de los mataderos.

Con un pretratamiento EDAR, para evaluar el impacto causante de las bacterias en los lugares donde se vierten estas aguas provenientes de los mataderos, se eliminan aproximadamente el 99% de la carga microbiana.

De entre todas las especies de bacterias que se pueden encontrar en una planta de procesamiento cárnico, las más comunes entre las cuales caben destacar: *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Escherichia coli*,

Fusobacterium, *Bacteroides*, *Leuconostoc* y *Klebsiella*. De las bacterias Acetogénicas se incluyen *Acetobacterium*, *Clostridium* y *Desulfovibrio*.

Estas aguas, al tener un alto contenido en grasa y proteínas procedente de los residuos del matadero, hacen que se trate de un buen sustrato para la digestión anaerobia por su gran producción de metano (Jabari et al., 2016).

1.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, fue aislada y caracterizada por primera vez en 1885 por el microbiólogo Theodor Escherich. Estas eran unos bacilos cortos y delgados que se encontraron en las heces de bebé, y fue nombrada como *Bacterium coli commune*. Más tarde, este microorganismo fue descrito por otros investigadores y no fue reconocido el nombre de *Escherichia coli* hasta 1954.

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa, oxidasa-negativa, con forma de coco-bacilo, capaz de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y a una temperatura de 37°C. Esta bacteria puede ser inmóvil o móvil, con flagelos peritricos.

Escherichia coli es una bacteria que se puede aislar muy fácilmente a partir de muestras fecales e incubar en placas con medios selectivos como podría ser el MacConkey-agar.

El ADN de *E. coli* se puede mover por mecanismos como la conjugación, transformación y transducción, dando lugar a la transferencia de genes y de elementos genéticos como transposones, secuencias de inserción, bacteriófagos y plásmidos, que hacen que se proporcionen nuevos rasgos y ventajas de acondicionamiento de la bacteria en el huésped. Esto hace que aparezcan nuevas cepas con diferentes factores de virulencia, de ahí la multitud de cepas conocidas y por conocer (Croxen et al., 2013).

La adquisición de nuevos genes a través de la transferencia horizontal de genes proporciona a la bacteria una gran variedad de rasgos nuevos, aunque la pérdida de genes también afecta, y puede favorecer a la bacteria en lo que se refiere a la capacidad de patogenicidad y de adaptación al huésped.

Estas bacterias al poseer la capacidad de ganancia y pérdida de genes, los cuales pueden ser resistentes a antibióticos. Una de estas resistencias se puede basar en la producción del plásmido que codifica para β -lactamasa. Hasta hoy en día se conocen unos 600 tipos diferentes de genes, agrupándose en cinco grupos y, a su vez, pueden estar extendidos por diferentes regiones geográficas. Estos cambios en los genes de la bacteria pueden afectar de forma considerable a la industria de la producción de alimentos, en este caso en la producción de alimentos cárnicos.

Esta bacteria es conocida como un comensal inofensivo del tracto gastrointestinal, sobre todo en animales de sangre caliente. Sin embargo, hay muchas cepas de *E. coli* debido a la ganancia y pérdida de genes, lo cual le permite ser un patógeno muy diverso y potencialmente adaptado. La bacteria *E. coli* patógena puede causar una amplia gama de enfermedades humanas extendidas por el tracto gastrointestinal e incluso extraintestinal como puede ser el tracto urinario, el sistema nervioso central y el torrente sanguíneo (Croxen et al., 2013).

Una de las enfermedades más características y de la que es contribuyente esta bacteria enterotoxigénica es la diarrea. Causante de mortalidad en el mundo, sobre todo y especialmente en niños menores de 5 años.

Se pueden diferenciar 7 tipos de bacterias *E. coli* causantes de diarreas:

- *E. coli* enteropatogénica (EPEC),
- *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC),
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC),
- *Shigella* / *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) ,
- *E. coli* enteroagregante (EAEC),
- *E. coli* (DAEC) difusamente adherente y
- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), siendo este el mas reciente.

Como otras bacterias diarreogénicas, *E. coli* EPEC, se transmite de un huésped a otro a través de la vía fecal-oral a través de superficies contaminadas, fluidos de destete incluso, portadores humanos, como ocurre en

los mataderos, que la mayoría de las veces la contaminación de la carne por *E. coli*, puede ser por los restos que puedan portar los trabajadores. En general, EPEC es un organismo que pertenece a un grupo de bacterias patógenas capaz de causar lesiones en la superficie del epitelio intestinal del huésped.

Aunque sea raro, hay brotes en los adultos que parece que hayan ocurrido debido a la ingestión de alimentos y agua contaminada. Sin embargo, no se ha detectado ningún reservorio ambiental específico que pueda ser uno de los probables focos de infección.

1.2 Resistencia a antibióticos

Los antimicrobianos son ampliamente utilizados no solo para tratar las infecciones bacterianas en humanos, sino también en animales y en la producción animal. Sin embargo, el uso abusivo de estos hace que haya una serie de microorganismos patógenos que se hacen resistentes extendiéndose por el agua y por el medio ambiente. La propagación de estos microorganismos y su desarrollo respecto a la resistencia es objeto de estudio a nivel mundial de gran importancia debido a los peligros para la salud pública.

La contaminación de los productos cárnicos procesados en mataderos, la mayoría de las veces ocurre por contaminación fecal de los canales de procesado durante el sacrificio de los animales. Debido a la presencia de patógenos, es difícil identificar el número de especies de microorganismos que se pueden encontrar, así como encontrar el origen específico de los canales, ya que puede ocurrir en cualquier punto del procesado (Wu et al., 2009).

La propagación de bacterias resistentes a muchos antimicrobianos está descrita como un peligro humano, el uso de antimicrobianos humanos en el tratamiento de animales, hace que la resistencia antimicrobiana sea inevitable.

En un procesamiento individual, se hizo un seguimiento del proceso del animal, una vez sacrificado y dividido en tres partes se tomaron muestras de esas zonas. En este caso, se desarrollaron modelos que mostraban las medidas de la línea de procesado repetidamente, evaluando de tal manera el impacto de la etapa, en la que se realizó el muestreo, la prevalencia de la resistencia a la tetraciclina (TET). Se observó un descenso en los recuentos totales de *E. coli* y

en los recuentos de los resistentes a la TET en los diferentes canales de procesado. Además, hay que tener en cuenta otro factor como es la contaminación cruzada entre los animales de las diferentes zonas de recogida de muestras (Wu et al., 2009).

En general, consideramos que hay sobre todo dos factores que pueden inducir la resistencia a los antibióticos de uso frecuente, tales pueden ser el transporte, en este caso de animales, y la migración, dando lugar a la diseminación de genes.

Habiendo un creciente interés en los estudios sobre la resistencia a los antibióticos de bacterias transmitidas a través de alimentos, estas bacterias podrían ser consideradas como grandes reservorios de dicha resistencia.

En un estudio realizado en el Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, se investigó la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos y Biocidas durante la producción y el procesamiento de carne. En este estudio, se analizaron los grupos psicrótrofos y mesófilos resistente de *Pseudomonas* sp., y también *E. coli*, *Staphylococcus* sp. y *Lactobacillus* sp. (Lavilla Lerma et al., 2013).

En un estudio en el que se trató carne perteneciente a dos mataderos, uno de ganado adulto y otro de terneros, se analizó el agua de las EDAR, habiendo aislamientos de *E. coli* resistentes que estaban presentes en los efluentes donde fueron recogidas las muestras. En el caso de los aislamientos de ganado adulto, estas bacterias fueron resistentes a tetraciclina, ampicilina, sulfonamidas y Estreptomicina. Sin embargo, en los aislamientos de terneros, se detectaron unos porcentajes más altos de resistencia para tetraciclina, ampicilina, sulfonamidas, estreptomicina y trimetoprima.

La proporción de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos usados en los mataderos anteriormente nombrados, muestran los aislamientos obtenidos de varias cepas en los diferentes puntos de muestreo como son aguas residuales, efluentes tratados y lodos activados y espesados (Fig. 1) (Um et al., 2016).

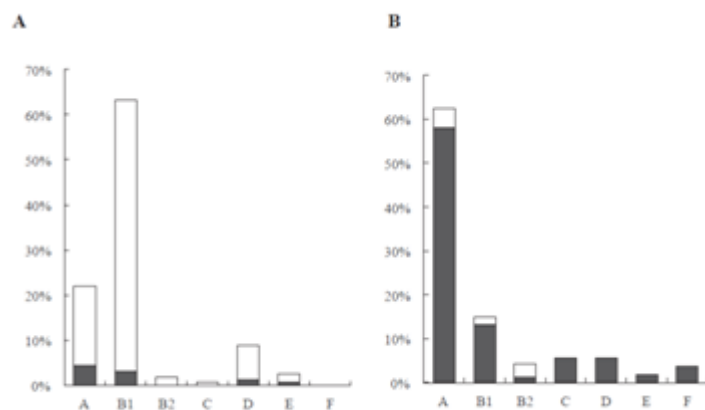


Fig. 1. Distribución filogenética de *E. coli* aislados de bovinos adultos (A) y *E. coli* aislados de mataderos de ternera (B). En cada matadero, los aislamientos de *E. coli* se evaluaron por punto de muestreo.

Conforme a la eficacia de los antibióticos usados en los dos mataderos hay una diferencia en porcentajes en cuanto a resistencia se refiere (Fig. 2) (Um et al., 2016).

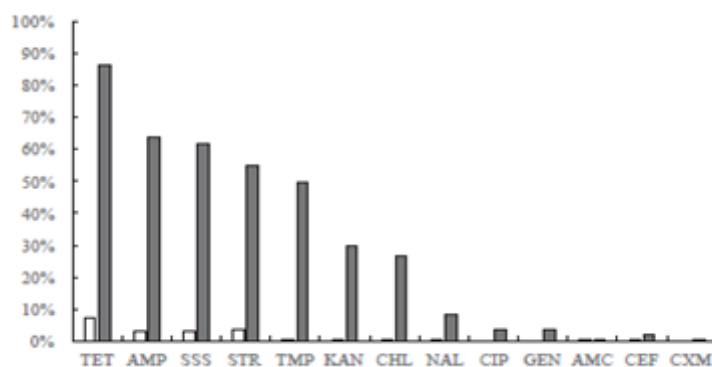


Fig. 2. Porcentajes de *E. coli* resistente a los antibióticos aislados de bovinos adultos (barras blancas) y terneros (barras grises) de los mataderos. AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; CEF, cefalotina; CXM, cefuroxima; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; Kan,

kanamicina; NAL, ácido nalidíxico; SSS, sulfonamidas; STR, estreptomicina; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprima.

En un ensayo con *Pseudomonas* sp., se estudió el tipo de población, la especie y la zona de muestreo de esta bacteria en un matadero, con el fin de poder encontrar una posible zona de origen de contaminación y tratar de evitar la propagación de las bacterias a lo largo de la cadena de producción de carne. Comprobaron la susceptibilidad y la variación de su concentración mínima inhibitoria (MIC) y se observó que había resistencia a 16 antibióticos. En la siguiente tabla se muestran los 16 antibióticos aplicados a las 4 especies de *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. lundensis*, *P. fluorescens* y *P. alkylphenolia*) (Lavilla Lerma et al., 2014).

Antibiotic and species	No. of isolates in each MIC range ^e (µg/ml)										MIC breakpoint (µg/ml)	No. of resistant strains
	≥1-<2	≥2-<4	≥4-<8	≥8-<16	≥16-<32	≥32-<64	≥64-<128	≥128-<256	≥256-<512	≥512		
Amoxicillin												
<i>P. putida</i>						1			1		≥32 ^a	2
<i>P. lundensis</i>		4		1	2	1	11	1	4	7		24
<i>P. fluorescens</i>					1					2		2
<i>P. alkylphenolia</i>							1			1		2
Ampicillin												
<i>P. putida</i>							1		1		≥32 ^a	2
<i>P. lundensis</i>		4		1	1	2	9	1	4	9		25
<i>P. fluorescens</i>							1		1	1		3
<i>P. alkylphenolia</i>									1	1		2
Ceftazidime												
<i>P. putida</i>						1				1	≥32 ^b	2
<i>P. lundensis</i>		2		2	5	2	4		2	14		22
<i>P. fluorescens</i>					1		1			1		2
<i>P. alkylphenolia</i>					2							0
Imipenem												
<i>P. putida</i>	1	1									≥16 ^b	0
<i>P. lundensis</i>	10	7	9	4	1							1
<i>P. fluorescens</i>	1	1			1							1
<i>P. alkylphenolia</i>	2											0
Gentamicin												
<i>P. putida</i>			2								≥16 ^b	0
<i>P. lundensis</i>		7	10	8	2		1	3				6
<i>P. fluorescens</i>		2	1									0
<i>P. alkylphenolia</i>		2										0
Kanamycin												
<i>P. putida</i>			1	1							≥64 ^a	0
<i>P. lundensis</i>		11	0	6	8	2	3	1				4
<i>P. fluorescens</i>			1	2								0
<i>P. alkylphenolia</i>			2									0
Streptomycin												
<i>P. putida</i>					1	1					≥64 ^a	0
<i>P. lundensis</i>		1	1	4	12	5	2	4		2		8
<i>P. fluorescens</i>		2			1							0
<i>P. alkylphenolia</i>					1		1					1
Rifampin												
<i>P. putida</i>							2				≥32 ^d	2
<i>P. lundensis</i>		2	1		3	16	5	3	1			25
<i>P. fluorescens</i>						2	1					3
<i>P. alkylphenolia</i>						2						2
Sulfamethoxazole												
<i>P. putida</i>										2	≥512 ^b	2
<i>P. lundensis</i>										31		31
<i>P. fluorescens</i>										3		3
<i>P. alkylphenolia</i>										2		2
Trimethoprim												
<i>P. putida</i>			1							1	≥16 ^a	1
<i>P. lundensis</i>			2	7		1	1	2	1	17		22
<i>P. fluorescens</i>									2	1		3
<i>P. alkylphenolia</i>										2		2

TABLE 1 (CONTINUED)

Antibiotic and species	No. of isolates in each MIC range ^a (μg/ml)										MIC breakpoint (μg/ml)	No. of resistant strains
	≥1.<2	≥2.<4	≥4.<8	≥8.<16	≥16.<32	≥32.<64	≥64.<128	≥128.<256	≥256.<512	≥512		
Colistin												
<i>P. putida</i>	1	1									≥8 ^b	0
<i>P. lundensis</i>	7	4	2	1	1	4	1			11		20
<i>P. fluorescens</i>	1	1	1									1
<i>P. alkylphenolia</i>	1	1										0
Polymyxin B												
<i>P. putida</i>	1	1									≥8 ^b	0
<i>P. lundensis</i>	10	6	1						1	13		15
<i>P. fluorescens</i>	2	1										0
<i>P. alkylphenolia</i>	2											0
Erythromycin												
<i>P. putida</i>										2	>4 ^c	2
<i>P. lundensis</i>	4			1		1	9	9		7		27
<i>P. fluorescens</i>						1		2				3
<i>P. alkylphenolia</i>										2		2
Chloramphenicol												
<i>P. putida</i>										2	≥32 ^b	2
<i>P. lundensis</i>			3		8	9		5	1	5		20
<i>P. fluorescens</i>				1	1		1					2
<i>P. alkylphenolia</i>								1	1	1		2
Ciprofloxacin												
<i>P. putida</i>	2										≥4 ^b	0
<i>P. lundensis</i>	29	1	1									2
<i>P. fluorescens</i>	3											0
<i>P. alkylphenolia</i>	2											0
Tetracycline												
<i>P. putida</i>				2							≥16 ^b	0
<i>P. lundensis</i>	10	3	7	6		1	2	1	1			11
<i>P. fluorescens</i>	1	1	1									0
<i>P. alkylphenolia</i>				2								2

^a In the case of nondescribed antibiotics, we considered the breakpoint values suggested by CLSI (35) for *E. coli*.

Tabla 1. Susceptibilidad y variedad de los distintos antibióticos para determinar la MIC.

1.3 Resistencia a biocidas

Los biocidas son agentes microbianos químicos que contienen una o más sustancias activas u organismos, cuyo objetivo es destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control sobre la propagación de enfermedades infecciosas.

Los biocidas están organizados en 23 tipos de productos que se utilizan para tal uso, y a su vez están divididos en cuatro grandes grupos:

- Grupo 1: desinfectantes y biocidas generales.
- Grupo 2: conservantes.
- Grupo 3: plaguicidas.
- Grupo 4: otros biocidas.

Un excesivo y mal uso de los biocidas en diferentes zonas como pueden ser complejos hospitalarios, industrias alimentarias y casas, y siendo componentes de muchos productos usados habitualmente, puede dar lugar a casos de intolerancia y resistencia a estos agentes.

A día de hoy, la resistencia a biocidas y a antibióticos se está considerando un problema de salud pública, aun mas extendido por los países desarrollados en los que el abuso de estos hace que baje la efectividad.

La bajada de la efectividad de los biocidas proporciona un aumento de la diseminación de bacterias resistentes haciendo posible la distribución y propagación tanto a seres humanos como al medio ambiente provocando un gran impacto.

La primera vez que los biocidas se empezaron a utilizar fue entre 1950 y 1960, y creció el uso en las diferentes industrias. Se desarrolló la resistencia bacteriana a los biocidas y antibióticos provocando la intranquilidad ya que también se daba lugar a la resistencia cruzada. Distintos biocidas participaron en la selección y persistencia de la resistencia bacteriana, como agentes catiónicos (clorhexidina, cloruro de benzalconio, diamidinas y acridinas).

Los alimentos provenientes de la carne son los más suspicaces a la contaminación por microorganismos bacterianos. En el caso de los mataderos, se considera un ambiente ideal para el crecimiento y desarrollo bacteriano por razones de los varios procedimientos que se llevan a cabo para el procesado de la carne, y la serie de zonas (zona de sacrificio, corte y zona de eviscerado) y los canales por los que pasa la carne (tabla 2) (Lavilla Lerma et al., 2013).

Antimicrobial	Zone										
	E	SR	F1	CR	F2	F3	FrT	F4	WR	MP	Total (%)
	Number of strains										
Chlorhexidine	3	13	0	22	1	3	0	5	5	4	56 (10.3)
Benzalkonium	2	16	3	9	1	7	0	3	2	7	50 (9.2)
Hexadecylpyridinium	1	4	1	7	2	1	0	4	1	4	25 (4.6)
Cetrimide	2	4	1	9	0	0	0	4	2	5	27 (5.0)
PHMG	2	11	2	4	0	0	0	4	4	3	30 (5.5)
Hexachlorophene	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1	8 (1.5)
Triclosan	3	11	1	11	2	0	0	5	6	8	47 (8.7)
Oxonia 6P	2	12	0	4	0	3	0	5	4	2	32 (5.9)
Amoxicillin	2	23	7	29	2	7	1	8	5	6	90 (16.6)
Cefuroxime	4	27	5	25	2	7	1	6	7	8	92 (16.9)
Ciprofloxacin	0	8	1	5	0	2	0	1	3	1	21 (3.9)
Erythromycin	5	19	1	16	1	4	0	4	6	9	65 (12.0)
Total	29	151	22	142	11	34	2	49	45	58	543

Tabla 2. Distribución de aislamientos resistentes a biocidas o antibióticos según la zona del matadero. E: entrada; SR: sala de sacrificio; F1: nevera 1; CR: sala de despiece; F2: nevera 2; F3: nevera 3; FrT: túnel de congelación; F4: nevera 4; WR: sala blanca y MP: productos cárnicos.

Como se muestra en un estudio de Lavilla Lerma et al. (2013) sobre la resistencia a biocidas, la clorhexidina fue la que tuvo mayor frecuencia en bacterias resistentes en comparación con otros antimicrobianos. En la selección de *E. coli*, los biocidas a los que presento resistencia fueron benzalconio, PHMG, cetrimida y clorhexidina.

Conforme los grupos bacterianos estudiados, podemos observar el porcentaje de resistencia ofrecido según el tipo de bacterias a los biocidas utilizados en el estudio (Fig. 3) (Lavilla Lerma et al., 2013).

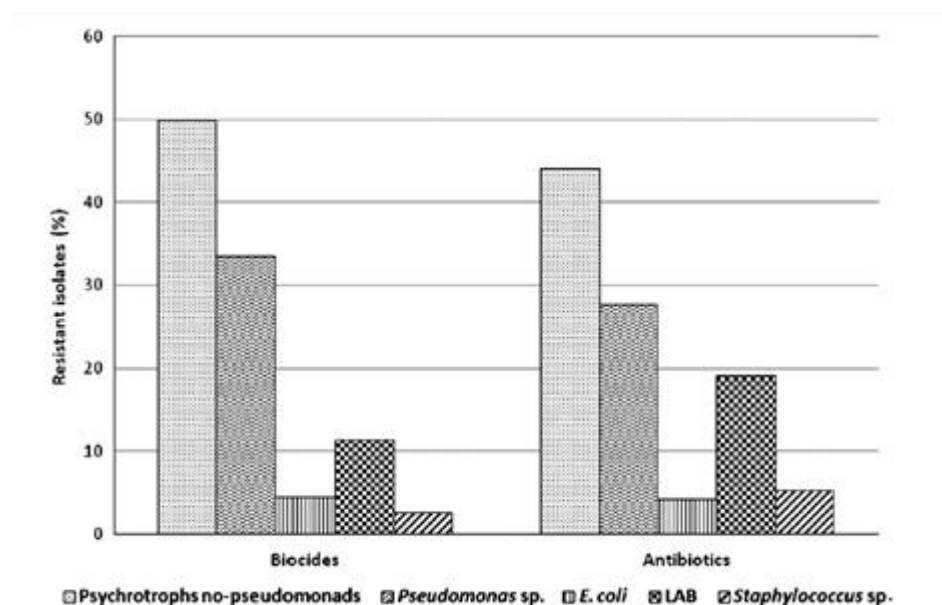


Fig. 3. Resistencia a biocidas y antibióticos según el grupo microbiano.

1.4 Medidas para frenar la diseminación de la resistencia en la cadena alimentaria

Entre las medidas que hay que seguir para disminuir la diseminación de la resistencia en un matadero cabe destacar lo siguiente:

- Usar los diferentes biocidas de forma rotacional en cada zona que se trate con desinfectantes frecuentemente. No usando siempre el mismo ya que las bacterias al tener la capacidad de desarrollar resistencia, puede llegar el momento en que produzca resistencia y el antibiótico no cumpla con su función (Lavilla Lerma et al., 2013).
- Control de las zonas clave y en las que hay una mayor frecuencia de contaminación por traslado como pueden ser las zonas de lavado del animal, la zona de sacrificio y despiece. Pudiendo ser una buena estrategia para disminuir peligros de transmisión y problemas en la seguridad alimentaria.
- Practicas de higiene y desinfección, incorporando duchas para eliminar la mayoría de microorganismos de la lana de los animales y los pies, y también desinfectar el ambiente de entrada de los animales (Lavilla Lerma et al., 2014).
- Lavado de manos y desinfección de los trabajadores y los instrumentos utilizados en el procesamiento de la carne.

2. OBJETIVOS

1. Determinar la susceptibilidad de cepas de *Escherichia coli* a antibióticos usados en la clínica.
2. Determinar la susceptibilidad de cepas de *Escherichia coli* a biocidas usados como desinfectantes en la industria alimentaria.
3. Correlación entre la resistencia a antibióticos y biocidas.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Bacterias

Las cepas de *E. coli* han sido aisladas de diferentes áreas de un matadero. Las cepas de *E. coli* utilizadas han sido once:

- 1: M4V03.1 (Lavabo 1 matadero)
- 2: M9VB.12 (Desagüe 1 matadero)
- 3: M12.V.10 (Desagüe cámara fría 1)
- 4: M14.V.04 (Mesa 1 sala despiece)

- 5: M28.V.07 (Suelo cámara 4)
- 6: M30.V.04.1 (Fregadero sala blanca)
- 7: M32.V.13.1 (Tabla de cortar sala blanca)
- 8: M33.V.1 (Cortadora sala blanca)
- 9: M33.V.01.2 (Cortadora sala blanca)
- 10: M33.V.01.5 (Cortadora sala blanca)
- 11: M33.V.04.1 (Cortadora sala blanca)

En la siguiente imagen de Lavilla Lerma et al. (2013), siendo modificado por puntos rojos, se observan las diferentes zonas del matadero y de donde se han recogido las muestras de cepas de *E. coli*. Como se puede observar, el punto rojo con el número 1 hace referencia a que la cepa 1: M4V03.1, ha sido recogida en ese punto del mapa del matadero, en este caso, en el lavabo 1 del matadero. Y así se ha ido haciendo una por una, tal y como se indica en la Fig. 1. En el caso de la sala blanca, ahí se han recogido más cepas que en los otros lugares del matadero y, en esta sala, obtuvimos las cepas numeradas del 6 al 11.

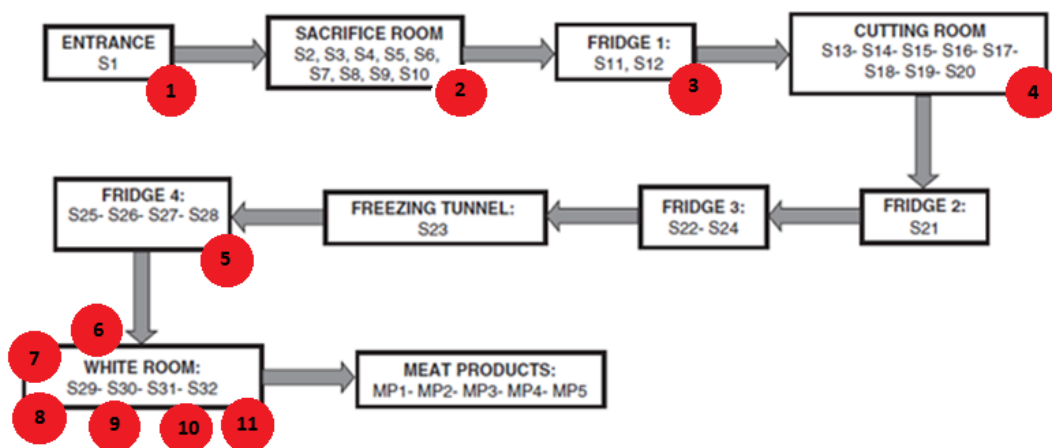


Fig. 1. Organigrama de la cadena de producción de carne en un matadero de corderos y cabras de Jaén. Muestra 1: lavabo 1; muestra 2: desagüe 1; muestra 3: desagüe cámara fría 1; muestra 4: mesa sala de despiece; muestra 5: suelo cámara 4; muestras 6: fregadero sala blanca; muestra 7: tabla de cortar sala blanca; muestras 8, 9, 10 y 11: equipos sala blanca.

3.2 Medios de cultivo

El inóculo se preparó cogiendo con el asa de siembra del tubo de semilla que contenía cada cepa e inoculándolas en un tubo que contenía 5 ml de caldo Mueller-Hinton. Esta suspensión bacteriana se incubó a 37°C durante 24 horas hasta que estaba visiblemente turbio.

El medio de cultivo caldo de Mueller-Hinton (MHB) se preparó a partir del medio comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Scharlau, España) y por lo tanto suspendiendo 38 g en 1 litro de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 118-121°C durante 15 minutos.

Su composición por litro es la siguiente:

Peptona.....17.5 g

Infusión de carne.....2.0 g

Almidón.....1.5 g

3.3 Agentes antimicrobianos

3.3.1 Antibióticos

Los antibióticos usados fueron los siguientes: ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacino, tetraciclinas y eritromicina. Para la preparación de cada antibiótico se hizo lo siguiente:

- Se pesa el antibiótico a razón de 10 mg.
- Disolver en agua MQ estéril excepto tetraciclina que se hace en etanol (5 ml de MQ + 5 ml de etanol absoluto= 10 ml).
- La concentración final del antibióticos es de 1 mg/ml.

Preparar las diluciones del medio MHB con el antibiótico correspondiente: 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 µg/ml. En un volumen final de 5 ml.

Primero preparamos la concentración más alta y de esta vamos haciendo las diluciones $\frac{1}{2}$.

10 ml de 256 $\mu\text{g/ml}$ $\rightarrow$ 2.56 ml de antibiótico a 1 mg/ml y 7.44 ml de agua MQ.

Se dispone en la placa de microtitulación de 96 pocillos (en forma de U) de la siguiente manera: 200 μl de medio + antibiótico (a cada concentración ensayada), previamente preparado, y 20 μl de inóculo de bacteria crecida durante 24 h a 37°C. Se necesitan 5 placas para disponer en ellas las 11 cepas de *E. coli* para cada antibiótico. En Estas placas las cepas van a estar distribuidas en base a la concentración de antibiótico que utilizamos para conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Primero ponemos en los tres primeros pocillos para cada cepa 200 μl de medio MHB sin el antibiótico que servirá como control, en los siguientes tres pocillos ponemos de igual manera los 200 μl pero de la concentración superior y así hasta finalizar con todas las concentraciones de forma consecutiva (Fig. 2.).

CEPA 1	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256	8	8	8
CEPA 2	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
CEPA 3	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
CEPA 3	64	64	64	128	128	128	256	256	256	8	8	8
CEPA 4	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
CEPA 5	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
CEPA 6	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
CEPA 7	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
										8	8	8
CEPA 8	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
CEPA 9	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
										8	8	8
CEPA 10	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
CEPA 11	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
										8	8	8

Fig.2. distribución de las cepas y la concentración de antibiótico que se va a disponer en cada pocillo, replicado por 3 veces.

Una vez que hemos puesto en cada pocillo su correspondiente cantidad de antibiótico, echamos los 20 μl de inóculo de bacteria y resuspendemos varias veces con la pipeta.

Una vez que ya están todas las cepas inoculadas en cada pocillo, se pone la tapa de baja evaporación y se lleva a la estufa a 37°C. Tras 24 horas de incubación, se analizan los datos de crecimiento tanto visualmente como mediante el uso del lector de placas: BIO-RAD iMark™. Microplate reader, para la medida de la densidad óptica del pocillo a una longitud de onda de 595 nm. La MIC se define como la concentración mínima del antibiótico que inhibe el crecimiento (ausencia de turbidez) y cuya densidad óptica es similar a la de los pocillos no inoculados (control negativo). Los controles negativos corresponderán a 3 pocillos solo con el medio de cultivo.

3.3.2 Biocidas

Los biocidas utilizados fueron los siguientes: clorhexidina y cloruro de benzalconio.

De igual manera que los antibióticos, pero en este caso no se utiliza agua MQ estéril, sino etanol absoluto para la disolución de estos antimicrobianos.

El modo de preparación de las diluciones de los biocidas es de la misma manera que de los antibióticos, solo que en este caso, la concentración que se añade de biocida es menor. A la preparación de la dilución de mayor concentración, le añadiremos 200 µl de biocida (1g/ml) + 9.8 ml de MHB.

En el caso de los biocidas se van a necesitar más placas debido a que se utiliza un mayor número de diluciones de biocidas. Se preparan 5 ml de volumen final a las diferentes concentraciones: 0.05 µg/ml, 0.1, 0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml.

CEPA 1	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200						
CEPA 2	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200				B	B	B
CEPA 5	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200						
CEPA 6	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200				B	B	B
CEPA 8	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200						
CEPA 9	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200				B	B	B
CEPA 3	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200						
CEPA 4	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200				B	B	B
CEPA 7	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200						
CEPA 10	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200						
CEPA 11	C	C	C	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	3,125	3,125	3,125
	6,25	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25	25	25	50	50	50
	100	100	100	200	200	200				B	B	B

Fig. 3. distribución de las cepas y la concentración de biocida que se va a disponer en cada pocillo, replicado por 3 veces.

3.4 Determinación de la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos

La susceptibilidad se determinó mediante la medida de la densidad óptica de los distintos pocillos de las placas. Después de cada incubación, se determinó la MIC a la que cada agente inhibía el crecimiento de la cepa. Todas las determinaciones de las MICs de cada antimicrobiano se llevaron a cabo por triplicado, y se dieron como válidos los resultados cuando dos de las tres réplicas estaban de acuerdo.

4. RESULTADOS

Tras la incubación a 37°C de las diferentes placas de microtitulación con las cepas utilizadas, durante 24 horas en la estufa a 37°C, se procedió a la lectura de los resultados de forma visual y también usando el lector de placas BIO-RAD. A continuación se muestran los resultados obtenidos para ambos antimicrobianos y para cada cepa de *E. coli*. En cuanto a los antibióticos, para categorizar una cepa si es sensible o resistente a dicho antibiótico, se consideran los Break Point publicado por Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines (2017).

4.1 Susceptibilidad a antibióticos

4.1.1 Ampicilina

En la siguiente tabla se muestra la concentración de ampicilina a partir de la cual la cepa se considera resistente (MIC breakpoint) que es del orden de 8 µg/ml para ampicilina en *E. coli* según CLSI (2017). Para ello se determina la MIC de dicho antibiótico a partir de la cual no se detecta ningún crecimiento en los pocillos y por lo tanto la ausencia de turbidez. Si la MIC es superior a 8 µg/ml la cepa se considera resistente, y si la MIC es inferior a 8 µg/ml la cepa se considera sensible. Para ello, comparamos los datos de densidad con el blanco y también observamos si hay presencia o ausencia de turbidez, y con ello determinamos la MIC. El blanco de estas placas se sitúa en las posiciones señaladas con un recuadro rojo. Las MIC están señaladas con círculos azules. La concentración máxima es de 256 µg/ml, se encuentra en todas las placas en las columnas 7, 8 y 9.

Penicillins ¹	MIC breakpoint (mg/L)	
	S ≤	R >
Benzylpenicillin	—	—
Ampicillin	8 ¹	8
Ampicillin-sulbactam	8 ^{1,2}	8 ²
Amoxicillin	8 ¹	8

E. coli M4V03.1: las concentraciones máximas ensayadas de 256 µg/ml, se encuentran en la posición C7, C8 y C9. Si lo comparamos con el blanco (medio sin inocular con la bacteria), la densidad óptica es mucho mayor y se observa turbidez. Por lo tanto, esta cepa ha crecido a todas las concentraciones ensayadas incluyendo 256 µg/ml que es mucho mayor que 8 µg/ml considerada como el punto de corte a partir del cual las cepas se consideran resistentes a la ampicilina de acuerdo con CLSI (2017). Por lo tanto *E. coli* M4V03.1 se considera resistente a ampicilina.

E. coli M9VB.12: en esta ocurre lo mismo que en la cepa 1 así que *E. coli* M9VB.12 (256 µg/ml) cepa 2 se considera resistente a ampicilina.

E. coli M12.V.10: se observa turbidez a todas las concentraciones ensayadas, y las densidades ópticas son mucho mayores que las del blanco. Por lo tanto, esta cepa es resistente a ampicilina.

E. coli M14.V.04: al comparar las densidades ópticas medidas de esta cepa con el blanco, se observan valores mayores, habiendo crecimiento en todos los pocillos con máxima concentración. Esta cepa se considera resistente a ampicilina.

E. coli M28.V.07: en esta cepa se ha podido determinar la MIC que es 128 µg/ml a partir de la cual la cepa no podría crecer, pero en este caso *E. coli* M28.V.07 se considera resistente ya que la MIC de ampicilina en esta cepa es mayor que el punto de corte establecido por la CLSI (8 µg/ml).

E. coli M30.V.04.1: se considera sensible, debido a que la MIC es de 4 µg/ml, y en el comité de europeo de pruebas de susceptibilidad indica que una cepa de *E. coli* es sensible a la ampicilina cuando la MIC es menor que 8 µg/ml. De forma visual, no se observaba turbidez a partir de esa concentración en la placa y el valor de densidad óptica es muy próximo al del blanco.

E. coli M32.V.13.1: aunque en este caso la densidad óptica obtenida al medir la placa es un poco mayor que la del blanco, no se observaba turbidez y con ello crecimiento de la cepa en el medio con ampicilina. Al ser la MIC de 4 µg/ml, y por tanto, menor que 8 µg/ml, *E. coli* M32.V.13.1 se considera sensible.

E. coli M33.V.1: la MIC es 4 µg/ml, por lo tanto, esta cepa es sensible a la ampicilina.

E. coli M33.V.01.2: en este caso no se determinó la MIC ya que la cepa es resistente. Se observa turbidez y crecimiento en todos los pocillos.

E. coli M33.V.01.5: al comparar las densidades ópticas medidas de esta cepa con el blanco, se observan valores mayores, habiendo crecimiento en todos los pocillos con máxima concentración. Esta cepa se considera resistente puesto

que no se ha podido determinar la MIC y en este caso sería mayor que 8 µg/ml.

E. coli M33.V.04.1: los valores de la densidad óptica medida son mayores a las del blanco incluyendo las de la máxima concentración. Por lo tanto, esta cepa se considera resistente.

A continuación se muestran las medidas de la densidad óptica obtenidas en las diferentes placas en presencia de diferentes concentraciones de ampicilina.

- Medida de la densidad óptica en la Placa 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M4V03.1	A	1,065	1,151	1,169	1,205	1,159	1,202	1,241	1,19	1,246	1,253	1,19	1,074
	B	1,218	1,229	1,208	1,146	1,148	1,162	1,172	1,184	1,175	1,163	1,133	0,952
	C	0,946	0,966	1,033	0,609	0,629	0,654	0,639	0,658	0,67	0,07	0,071	0,085
M9VB.12	D	1,284	1,32	1,367	1,397	1,411	1,371	1,454	1,441	1,417	1,369	1,395	1,095
	E	1,168	1,381	1,371	1,373	1,324	1,38	1,292	1,286	1,381	1,351	1,331	0,98
	F	1,275	1,412	1,404	1,224	1,216	1,31	1,245	1,222	1,278	0,102	0,108	0,104
M12.V.10	G	1,333	1,317	1,285	1,198	1,187	1,191	1,263	1,232	1,257	1,276	1,266	1,184
	H	1,339	1,351	1,341	1,223	1,188	1,253	1,202	1,202	1,268	1,151	1,152	0,991

- Medida de la densidad óptica en la Placa 2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M12.V.10	A	0,818	0,995	0,996	0,57	0,571	0,63	0,724	0,315	0,678	0,102	0,116	0,147
	B	1,301	1,258	1,275	1,213	1,23	1,231	1,255	1,266	1,28	1,239	1,125	0,951
M14.V.04	C	1,407	1,289	1,272	1,213	1,205	1,215	1,164	1,204	1,188	1,17	1,06	0,803
	D	1,103	1,052	1,046	0,702	0,694	0,768	0,597	0,518	0,58	0,147	0,155	0,154
	E	1,336	1,303	1,29	1,325	1,319	1,326	1,343	1,354	1,338	1,28	1,116	0,815
M28.V.07	F	1,065	1,229	1,164	0,806	0,79	0,948	0,684	0,727	0,692	0,41	0,43	0,408
	G	0,689	0,668	0,524	0,094	0,098	0,104	0,086	0,088	0,092	0,052	0,053	0,055
	H	0,071	0,064	0,073	0,081	0,088	0,087	0,07	0,075	0,069	0,067	0,062	0,065

- Medida de la densidad óptica en la Placa 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M30.V.04.1	A	0,986	1,137	1,105	0,727	0,722	0,742	0,731	0,734	0,703	0,546	0,567	0,487
	B	0,18	0,514	0,191	0,131	0,137	0,141	0,127	0,131	0,139	0,132	0,14	0,143
	C	0,078	0,088	0,096	0,09	0,092	0,102	0,098	0,106	0,115	0,092	0,097	0,099
M32.V.13.1	D	0,839	0,976	0,896	0,779	1,162	0,82	0,741	0,933	1,021	0,592	0,605	0,611
	E	0,31	0,295	0,31	0,209	0,201	0,21	0,185	0,19	0,199	0,194	0,168	0,163
	F	0,118	0,122	0,124	0,139	0,109	0,113	0,104	0,104	0,104	0,041	0,032	0,03
	G	0,041	0,04	0,045	0,036	0,037	0,045	0,054	0,048	0,045	0,045	0,047	0,053
	H	0,061	0,059	0,065	0,08	0,083	0,082	0,069	0,075	0,07	0,065	0,061	0,065

- Medida de la densidad óptica en la Placa 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.1	A	0,548	0,539	0,711	0,731	0,778	0,717	0,706	0,701	0,671	0,734	0,713	0,914
	B	0,088	0,125	0,282	0,307	0,334	0,365	0,343	0,357	0,384	0,374	0,438	0,453
	C	0,081	0,104	0,226	0,269	0,295	0,311	0,307	0,322	0,338	0,255	0,287	0,316
M33.V.01.2	D	0,784	0,569	0,626	0,655	0,658	0,679	0,687	0,724	0,734	0,719	0,75	0,695
	E	0,738	0,433	0,533	0,552	0,58	0,593	0,567	0,602	0,609	0,568	0,566	0,57
	F	0,325	0,203	0,315	0,388	0,426	0,415	0,405	0,408	0,416	0,123	0,135	0,158
	G	0,041	0,044	0,067	0,07	0,083	0,076	0,058	0,064	0,06	0,063	0,081	0,114
	H	0,084	0,105	0,136	0,131	0,16	0,138	0,134	0,1	0,122	0,147	0,182	0,167

- Medida de la densidad óptica en la Placa 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.01.5	A	0,845	0,822	0,795	0,779	0,814	0,786	0,883	0,81	0,85	0,824	0,844	0,862
	B	0,908	0,961	0,899	0,878	0,834	0,797	0,725	0,902	0,877	0,968	1,055	0,949
	C	0,862	0,829	0,997	0,942	0,781	1,086	0,58	0,618	0,638	0,209	0,225	0,239
M33.V.04.1	D	0,646	0,694	0,753	0,97	1,139	1,141	1,156	1,293	1,228	1,207	1,195	1,308
	E	1,133	1,032	1,052	1,133	0,857	1,135	1,171	1,122	1,18	1,542	1,475	1,344
	F	1,348	1,344	1,364	1,248	1,294	1,291	0,679	0,772	0,767	0,097	0,098	0,087
	G	0,041	0,042	0,041	0,045	0,04	0,04	0,042	0,04	0,049	0,047	0,051	0,054
	H	0,084	0,084	0,085	0,095	0,098	0,096	0,094	0,092	0,083	0,507	0,448	0,388

4.1.2 Ciprofloxacino

A continuación, se muestra el punto de corte “MIC breakpoint” de ciprofloxacino para *E. coli* según CLSI (2017).

Fluoroquinolones	MIC breakpoint (mg/L)	
	S <	R >
Ciprofloxacin	0.25	0.5
Ciprofloxacin, <i>Salmonella</i> spp. ¹	0.06	0.06
Pefloxacin (screen), <i>Salmonella</i> spp. ¹	NA	NA
Levofloxacin	0.5	1

Siguiendo la misma estrategia que para la ampicilina, las cepas *E. coli* M33.V.1, M33.V.01.2, M33.V.01.5, M33.V.04.1 (8, 9, 10 y 11) se consideran resistentes, mientras que las cepas de *E. coli* M4V03.1, M9VB.12, M12.V.10, M14.V.04, M28.V.07, M30.V.04.1 y M32.V.13.1 (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) se consideran sensibles.

- Medida de la densidad óptica en la Placa 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M4V03.1	A		0,547	0,717	0,786	0,723	0,784	0,769	0,712	0,742	0,749	0,759	0,837	0,846
	B		0,119	0,17	0,314	0,303	0,321	0,317	0,338	0,357	0,402	0,376	0,431	0,462
	C		0,104	0,173	0,272	0,29	0,308	0,321	0,322	0,337	0,36	0,303	0,355	0,367
	D		0,617	0,776	0,816	0,822	0,825	0,796	0,765	0,802	0,822	0,866	0,908	0,843
M9VB.12	E		0,572	0,673	0,748	0,712	0,734	0,812	0,756	0,748	0,806	0,629	0,723	0,647
	F		0,239	0,286	0,344	0,342	0,371	0,368	0,308	0,3	0,342	0,174	0,196	0,246
M12.V.10	G		0,676	0,636	0,679	0,286	0,391	0,405	0,482	0,415	0,44	0,482	0,457	0,515
	H		0,348	0,353	0,393	0,337	0,389	0,368	0,301	0,321	0,309	0,265	0,273	0,307

- Medida de la densidad óptica en la Placa 2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M12.V.10	A	0.439	0.499	0.502	0.566	0.748	0.693	0.648	0.592	0.602	0.634	0.626	0.716
	B	1.202	0.935	0.75	0.244	0.392	0.426	0.421	0.389	0.369	0.354	0.405	0.54
M14.V.04	C	0.609	0.188	0.137	0.165	0.271	0.262	0.27	0.33	0.302	0.321	0.449	0.288
	D	0.316	0.216	0.165	0.241	0.366	0.367	0.367	0.385	0.37	0.199	0.211	0.243
M28.V.07	E	1.196	1.009	0.822	0.225	0.332	0.344	0.337	0.389	0.373	0.343	0.313	0.514
	F	0.707	0.301	0.234	0.264	0.244	0.414	0.344	0.345	0.342	0.319	0.329	0.291
	G	0.171	0.109	0.091	0.129	0.257	0.221	0.252	0.214	0.21	0.075	0.1	0.146
	H	0.073	0.08	0.1	0.111	0.17	0.152	0.144	0.108	0.127	0.136	0.131	0.174

- Medida de la densidad óptica en la Placa 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M30.V.04.1	A		0,993	1,013	0,988	0,55	0,441	0,623	0,398	0,486	0,47	0,505	0,568	0,658
	B		0,142	0,228	0,161	0,137	0,141	0,141	0,151	0,226	0,21	0,149	0,15	0,152
	C		0,096	0,097	0,098	0,091	0,1	0,107	0,1	0,11	0,113	0,1	0,101	0,104
	D		0,85	0,797	0,969	0,478	0,537	0,553	0,503	1,111	0,619	0,586	0,292	0,221
M32.V.13.1	E		0,658	0,648	0,621	0,581	0,549	0,562	0,56	0,466	0,548	0,256	0,234	0,211
	F		0,166	0,178	0,211	0,194	0,191	0,182	0,185	0,184	0,185	0,045	0,044	0,036
	G		0,044	0,044	0,051	0,045	0,044	0,039	0,043	0,04	0,044	0,048	0,049	0,054
	H		0,07	0,063	0,068	0,082	0,081	0,075	0,075	0,072	0,055	0,089	0,09	0,085

- Medida de la densidad óptica en la Placa 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M33.V.1	A		0,368	0,469	0,464	0,516	0,511	0,622	0,534	0,522	0,584	0,471	0,52	0,456
	B		0,278	0,281	0,286	0,261	0,25	0,258	0,265	0,273	0,282	0,239	0,243	0,241
	C		0,376	0,191	0,196	0,243	0,262	0,25	0,605	0,545	0,684	0,14	0,147	0,144
	D		1,252	1,166	1,1	0,354	0,38	0,318	0,327	0,306	0,312	0,305	0,293	0,256
M33.V.01.2	E		0,272	0,274	0,274	0,264	0,256	0,275	0,258	0,275	0,275	0,257	0,229	0,227
	F		0,222	0,227	0,2	0,236	0,214	0,224	0,356	0,721	0,815	0,078	0,066	0,061
	G		0,042	0,043	0,046	0,037	0,038	0,04	0,044	0,045	0,045	0,048	0,047	0,05
	H		0,066	0,062	0,075	0,079	0,088	0,084	0,07	0,078	0,071	0,097	0,329	0,097

- Medida de la densidad óptica en la Placa 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M33.V.01.5	A		0,95	0,879	0,94	0,402	0,451	0,436	0,449	0,458	0,441	0,447	0,432	0,416
	B		0,2	0,198	0,209	0,198	0,203	0,195	0,199	0,201	0,207	0,212	0,204	0,198
	C		0,171	0,183	0,158	0,164	0,176	0,182	0,533	0,651	0,953	0,204	0,197	0,128
	D		0,939	0,199	0,75	0,171	0,158	0,172	0,169	0,186	0,187	0,203	0,198	0,191
M33.V.04.1	E		0,15	0,168	0,174	0,182	0,174	0,181	0,198	0,206	0,212	0,208	0,203	0,181
	F		0,143	0,151	0,143	0,154	0,14	0,155	0,45	0,541	0,615	0,056	0,053	0,063
	G		0,037	0,038	0,035	0,034	0,027	0,033	0,027	0,023	0,028	0,031	0,033	0,044
	H		0,061	0,065	0,078	0,075	0,082	0,085	0,077	0,083	0,074	0,088	0,091	0,093

4.1.3. Tetraciclina

A continuación, se muestra el punto de corte “MIC breakpoint” de tetraciclina para *E. coli* según CLSI (2017). En este caso, no hay ningún valor asignado por lo tanto nos basamos en los datos de la bibliografía, sensible si es menor que 4 µg/ml y resistente si es mayor que 16 µg/ml (Reyes et al., 2004).

Tetracyclines	MIC breakpoint (mg/L)	
	S ≤	R >
Doxycycline	-	-
Minocycline	-	-
Tetracycline	-	-
Tigecycline ¹	1 ²	2 ²

Siguiendo la misma estrategia que para los otros antibióticos, las cepas *E. coli* M9VB.12, M30.V.04.1, M32.V.13.1, M33.V.01.5, M33.V.04.1 (2, 6, 7, 10 y 11) se consideran resistentes, mientras que las cepas de *E. coli* M4V03.1, M12.V.10, M14.V.04, M28.V.07, M33.V.1, M33.V.01.2 (1, 3, 4, 5, 8 y 9) se consideran sensibles.

- Medida de la densidad óptica en la Placa 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M4V03.1	A	0,715	0,783	0,768	0,662	0,694	0,69	0,654	0,633	0,633	0,674	0,652	0,818
	B	0,16	0,204	0,26	0,254	0,279	0,419	0,27	0,271	0,316	0,325	0,385	0,402
	C	0,142	0,148	0,221	0,249	0,265	0,3	0,283	0,314	0,328	0,264	0,288	0,311
	D	0,633	0,805	0,786	0,738	0,759	0,762	0,763	0,724	0,826	0,822	0,868	0,794
M9VB.12	E	0,467	0,624	0,595	0,527	0,598	0,594	0,549	0,521	0,583	0,595	0,635	0,557
	F	0,267	0,334	0,369	0,31	0,366	0,374	0,376	0,398	0,399	0,171	0,185	0,209
M12.V.10	G	0,604	0,592	0,681	0,331	0,374	0,497	0,547	0,46	0,42	0,461	0,442	0,461
	H	0,287	0,29	0,32	0,318	0,348	0,26	0,314	0,323	0,326	0,323	0,333	0,337

- Medida de la densidad óptica en la placa 2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M12.V.10	A	0,65	0,605	0,568	0,521	0,566	0,523	0,539	0,567	0,556	0,7	0,641	0,85
	B	1,018	0,863	0,78	0,315	0,337	0,348	0,351	0,392	0,41	0,41	0,45	0,482
M14.V.04	C	0,303	0,2	0,162	0,159	0,178	0,218	0,252	0,288	0,327	0,38	0,397	0,428
	D	0,294	0,33	0,273	0,308	0,274	0,286	0,353	0,371	0,379	0,251	0,27	0,298
M28.V.07	E	1,026	0,885	0,8	0,757	0,728	0,723	0,701	0,754	0,74	0,833	0,876	0,896
	F	0,881	0,74	0,645	0,536	0,508	0,542	0,383	0,439	0,482	0,362	0,549	0,371
	G	0,123	0,25	0,186	0,116	0,121	0,144	0,209	0,222	0,196	0,094	0,113	0,139
	H	0,077	0,086	0,101	0,101	0,105	0,111	0,114	0,092	0,114	0,122	0,12	0,142

- Medida de la densidad óptica en la Placa 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M30.V.04.1	A	0.801	0.816	0.755	0.731	0.734	0.75	0.756	0.745	0.748	0.777	0.826	0.803
	B	0.285	0.265	0.207	0.449	0.487	0.507	0.437	0.503	0.508	0.452	0.498	0.554
	C	0.311	0.295	0.317	0.252	0.322	0.321	0.375	0.444	0.468	0.233	0.255	0.279
M32.V.13.1	D	1.003	1.063	0.566	0.661	0.538	0.546	0.411	0.557	0.444	0.453	0.693	0.6
	E	0.306	0.299	0.27	0.574	0.462	0.519	0.449	0.515	0.498	0.415	0.411	0.396
	F	0.161	0.201	0.32	0.311	0.321	0.354	0.48	0.468	0.484	0.101	0.104	0.117
	G	0.041	0.044	0.045	0.045	0.044	0.048	0.044	0.049	0.049	0.052	0.062	0.074
	H	0.102	0.105	0.107	0.112	0.109	0.113	0.107	0.107	0.108	0.132	0.144	0.384

- Medida de la densidad óptica en la Placa 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.1	A	0.6	0.639	0.601	0.608	0.583	0.568	0.6	0.523	0.594	0.601	0.613	0.551
	B	0.124	0.111	0.114	0.112	0.132	0.15	0.308	0.207	0.224	0.254	0.285	0.298
	C	0.153	0.149	0.148	0.174	0.199	0.228	0.326	0.36	0.388	0.241	0.263	0.281
M33.V.01.2	D	0.834	0.763	0.763	0.238	0.268	0.281	0.27	0.303	0.311	0.307	0.32	0.328
	E	0.202	0.198	0.198	0.204	0.209	0.249	0.274	0.295	0.309	0.34	0.328	0.338
	F	0.175	0.158	0.169	0.204	0.213	0.216	0.33	0.362	0.353	0.118	0.121	0.117
	G	0.043	0.045	0.044	0.033	0.035	0.036	0.048	0.045	0.053	0.054	0.059	0.064
	H	0.094	0.097	0.098	0.107	0.107	0.108	0.104	0.106	0.096	0.122	0.13	0.134

- Medida de la densidad óptica en la Placa 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.01.5	A	0.956	0.963	0.946	0.895	0.948	0.929	0.881	0.87	0.89	0.858	0.831	0.791
	B	0.709	0.629	0.574	0.687	0.698	0.703	0.662	0.659	0.679	0.565	0.549	0.542
	C	0.568	0.482	0.47	0.422	0.41	0.327	0.474	0.465	0.459	0.158	0.173	0.192
M33.V.04.1	D	1.176	1.222	1.119	0.817	0.814	0.878	0.744	0.766	0.758	0.741	0.716	0.676
	E	0.703	0.639	0.624	0.754	0.761	0.737	0.624	0.669	0.717	0.554	0.559	0.58
	F	0.542	0.485	0.477	0.382	0.293	0.307	0.478	0.485	0.494	0.085	0.088	0.09
	G	0.03	0.033	0.033	0.035	0.025	0.033	0.028	0.029	0.037	0.033	0.035	0.044
	H	0.063	0.067	0.08	0.077	0.084	0.085	0.08	0.083	0.065	0.878	0.084	0.093

4.1.4. Cloranfenicol

Cloranfenicol no ha sido incluido en el comité europeo de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, en el caso de enterobacterias. Por ello, nos basamos en los datos de la bibliografía. Se considera sensible si es menor de 8 µg/ml y resistente si es mayor que 32 µg/ml (Reyes et al., 2004).

Siguiendo la misma estrategia que para los otros antibióticos, las cepas *E. coli* M4V03.1 , M9VB.12 , M12.V.10 (1, 2 y 3) se consideran resistentes, mientras que las cepas de *E. coli* M14.V.04, M28.V.07, M30.V.04.1, M32.V.13.1, M33.V.1, M33.V.01.2, M33.V.01.5, M33.V.04.1 (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11) se consideran sensibles.

- Medida de la densidad óptica en la Placa 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M4V03.1	A	1,037	1,059	1,02	0,99	0,973	1,003	1	0,997	1,027	0,961	0,943	0,831
	B	0,747	0,752	0,707	0,507	0,517	0,636	0,457	0,487	0,504	0,428	0,419	0,618
	C	0,331	0,279	0,264	0,467	0,288	0,317	0,327	0,364	0,377	0,807	0,201	0,217
M9VB.12	D	1,134	1,221	1,162	1,166	1,19	1,228	1,309	1,296	1,246	1,265	1,169	1,043
	E	0,926	0,973	1,021	0,898	0,958	1,029	0,952	1,043	1,026	1,003	1,034	0,846
	F	0,828	0,837	0,869	0,737	0,751	0,803	0,61	0,673	0,726	0,181	0,184	0,183
M12.V.10	G	1,227	1,129	1,1	0,971	1,027	1,049	1,034	1,033	1,067	1,022	0,995	0,942
	H	1,013	1,007	0,958	0,706	0,725	0,73	0,603	0,654	0,646	0,627	0,552	0,514

- Medida de la densidad óptica en la Placa 2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M12.V.10	A	0,547	0,685	0,589	0,539	0,586	0,637	0,629	0,662	0,656	0,556	0,582	0,53
	B	1,119	0,853	0,718	0,609	0,611	0,623	0,604	0,629	0,658	0,605	0,638	0,644
M14.V.04	C	0,868	0,64	0,504	0,258	0,288	0,333	0,296	0,303	0,309	0,289	0,319	0,355
	D	0,401	0,249	0,188	0,188	0,263	0,332	0,306	0,332	0,347	0,195	0,207	0,218
M28.V.07	E	1,177	0,952	0,819	0,743	0,726	0,776	0,729	0,765	0,761	0,783	0,772	0,731
	F	0,872	0,779	0,697	0,342	0,339	0,429	0,317	0,324	0,353	0,342	0,326	0,295
	G	0,318	0,163	0,112	0,092	0,141	0,175	0,168	0,16	0,145	0,066	0,074	0,087
	H	0,078	0,094	0,104	0,11	0,108	0,118	0,114	0,116	0,112	0,112	0,112	0,131

- Medida de la densidad óptica en la Placa 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M30.V.04.1	A	0,557	0,718	0,647	0,645	0,743	0,676	0,653	0,648	0,642	0,648	0,659	0,691
	B	0,357	0,365	0,401	0,394	0,392	0,475	0,376	0,375	0,352	0,364	0,392	0,389
	C	0,194	0,254	0,295	0,305	0,328	0,323	0,33	0,328	0,313	0,157	0,185	0,209
M32.V.13.1	D	0,827	0,847	0,818	0,806	0,775	0,787	0,776	0,824	0,81	0,706	0,768	0,778
	E	0,456	0,678	0,591	0,431	0,448	0,707	0,414	0,404	0,434	0,41	0,422	0,431
	F	0,213	0,339	0,323	0,286	0,301	0,316	0,178	0,284	0,297	0,088	0,107	0,146
	G	0,077	0,072	0,085	0,09	0,101	0,094	0,072	0,077	0,072	0,071	0,096	0,141
	H	0,139	0,125	0,152	0,158	0,176	0,157	0,149	0,119	0,13	0,291	0,269	0,124

- Medida de la densidad óptica en la Placa 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.1	A	0,513	0,529	0,53	0,512	0,601	0,607	0,605	0,62	0,635	0,694	0,684	0,834
	B	0,182	0,141	0,124	0,11	0,149	0,213	0,236	0,294	0,331	0,329	0,397	0,426
	C	0,153	0,105	0,094	0,096	0,139	0,184	0,224	0,265	0,302	0,211	0,247	0,283
M33.V.01.2	D	0,911	0,74	0,672	0,472	0,491	0,521	0,466	0,505	0,532	0,476	0,499	0,494
	E	0,252	0,206	0,18	0,165	0,187	0,236	0,273	0,308	0,347	0,364	0,396	0,406
	F	0,152	0,125	0,197	0,138	0,178	0,237	0,269	0,22	0,312	0,108	0,128	0,166
	G	0,042	0,041	0,042	0,045	0,04	0,045	0,046	0,059	0,057	0,062	0,085	0,127
	H	0,077	0,085	0,095	0,1	0,104	0,11	0,113	0,099	0,114	0,142	0,172	0,176

- Medida de la densidad óptica en la Placa 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.01.5	A	0,993	0,881	0,905	0,879	0,883	0,959	0,816	0,821	0,859	0,718	0,713	0,713
	B	0,462	0,425	0,423	0,303	0,323	0,347	0,348	0,375	0,39	0,37	0,364	0,361
	C	0,226	0,251	0,281	0,235	0,26	0,269	0,284	0,316	0,312	0,164	0,184	0,188
M33.V.04.1	D	1,416	1,206	0,748	0,901	1,139	1,163	0,717	1,621	1,251	0,693	0,619	0,663
	E	0,324	0,272	0,295	0,226	0,236	0,269	0,257	0,287	0,282	0,309	0,313	0,314
	F	0,159	0,149	0,167	0,161	0,148	0,164	0,189	0,194	0,207	0,109	0,102	0,099
	G	0,039	0,04	0,047	0,033	0,034	0,037	0,043	0,042	0,041	0,043	0,045	0,047
	H	0,075	0,071	0,077	0,086	0,094	0,086	0,073	0,081	0,076	0,098	0,09	0,1

4.1.5. Eritromicina

La eritromicina no ha sido incluida en el comité europeo de pruebas de susceptibilidad a los Antimicrobianos en el caso de enterobacterias. Por ello, nos basamos en los datos de la bibliografía, sensible menor que 4 µg/ml (Faría et al., 1998). Por lo tanto, todas las cepas *E. coli* M4V03.1, M9VB.12, M12.V.10, M14.V.04, M28.V.07, M30.V.04.1, M32.V.13.1, M33.V.1, M33.V.01.2, M33.V.01.5 y M33.V.04.1 se consideran resistentes.

- Medida de la densidad óptica en la Placa 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M4V03.1	A		0,96	0,84	0,695	0,626	0,691	0,744	0,701	0,686	0,729	0,686	0,768	0,724
	B		0,829	0,625	0,495	0,357	0,417	0,499	0,47	0,474	0,574	0,506	0,527	0,604
	C		0,619	0,351	0,227	0,179	0,262	0,344	0,338	0,352	0,381	0,595	0,585	0,393
	D		1,151	1,049	0,595	0,911	0,681	0,82	0,782	0,901	0,916	0,828	0,946	0,841
M9VB.12	E		0,957	0,782	0,67	0,412	0,518	0,55	0,52	0,535	0,56	0,502	0,535	0,564
	F		0,638	0,386	0,254	0,165	0,261	0,31	0,289	0,323	0,326	0,212	0,25	0,273
M12.V.10	G		1,2	0,861	0,688	0,597	0,6	0,661	0,598	0,617	0,695	0,666	0,673	0,743
	H		1,123	0,903	0,586	0,365	0,404	0,392	0,376	0,396	0,394	0,362	0,303	0,406

- Medida de la densidad óptica en la Placa 2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M12.V.10	A	0.73	0.723	0.769	0.688	0.74	0.735	0.652	0.251	0.668	0.231	0.238	0.271
M14.V.04	B	1.193	1.209	1.129	1.12	1.145	1.154	1.169	1.137	1.203	1.187	1.176	1.137
	C	1.088	1.09	1.079	1.014	1	1.021	0.924	0.92	0.929	0.831	0.786	0.782
	D	0.662	0.644	0.629	0.552	0.547	0.578	0.519	0.511	0.532	0.208	0.219	0.229
M28.V.07	E	1.172	1.185	1.183	1.159	1.17	1.19	1.197	1.225	1.24	1.207	1.21	1.16
	F	1.092	1.194	1.139	0.974	0.995	1.02	0.912	0.928	0.972	0.888	0.842	0.783
	G	0.794	0.728	0.714	0.59	0.586	0.605	0.521	0.537	0.551	0.088	0.093	0.087
	H	0.071	0.073	0.084	0.077	0.083	0.086	0.078	0.08	0.07	0.062	0.066	0.054

- Medida de la densidad óptica en la Placa 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M30.V.04.1	A		0,68	0,771	0,743	0,694	0,733	0,732	0,719	0,757	0,778	0,754	0,822	0,818
	B		0,27	0,32	0,349	0,355	0,399	0,418	0,419	0,431	0,451	0,436	0,48	0,524
	C		0,193	0,224	0,256	0,281	0,3	0,303	0,349	0,36	0,388	0,25	0,284	0,339
M32.V.13.1	D		0,706	1,064	0,883	0,72	0,736	1,114	0,814	0,781	1,169	0,992	0,94	0,864
	E		0,446	0,501	0,55	0,471	0,485	0,502	0,456	0,456	0,464	0,476	0,497	0,569
	F		0,284	0,347	0,302	0,343	0,301	0,46	0,365	0,368	0,41	0,133	0,15	0,201
	G		0,05	0,048	0,053	0,065	0,062	0,077	0,075	0,071	0,071	0,073	0,098	0,142
	H		0,112	0,115	0,126	0,126	0,153	0,13	0,128	0,141	0,124	0,154	0,167	0,174

- Medida de la densidad óptica en la Placa 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M33.V.1	A		0,705	0,717	0,678	0,674	0,686	0,733	0,718	0,776	0,774	0,777	0,829	0,814
	B		0,257	0,26	0,261	0,296	0,334	0,367	0,321	0,406	0,41	0,364	0,408	0,45
	C		0,081	0,096	0,129	0,172	0,209	0,223	0,299	0,325	0,354	0,272	0,3	0,338
M33.V.01.2	D		0,739	0,771	0,781	0,604	0,737	0,754	0,621	0,676	0,689	0,667	0,707	0,779
	E		0,344	0,361	0,346	0,387	0,415	0,418	0,402	0,423	0,436	0,45	0,469	0,541
	F		0,207	0,204	0,254	0,242	0,21	0,266	0,322	0,333	0,348	0,124	0,157	0,209
	G		0,042	0,044	0,043	0,042	0,044	0,054	0,064	0,067	0,073	0,067	0,092	0,135
	H		0,106	0,108	0,104	0,113	0,122	0,118	0,124	0,148	0,123	0,165	0,177	0,192

- Medida de la densidad óptica en la Placa 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.01.5	A	1.017	0.947	1.001	0.996	1.01	1.003	1.022	0.978	1.037	1.018	0.971	0.914
	B	0.84	0.763	0.769	0.71	0.74	0.756	0.642	0.641	0.697	0.612	0.544	0.579
	C	0.473	0.445	0.444	0.356	0.423	0.402	0.378	0.365	0.416	0.178	0.191	0.219
M33.V.04.1	D	0.979	0.823	1.062	0.875	0.866	0.858	0.844	0.868	0.9	0.873	0.866	0.85
	E	0.752	0.715	0.733	0.644	0.746	0.69	0.586	0.612	0.639	0.584	0.534	0.574
	F	0.463	0.425	0.454	0.341	0.387	0.403	0.364	0.376	0.419	0.093	0.1	0.105
	G	0.04	0.041	0.032	0.034	0.037	0.027	0.033	0.036	0.032	0.03	0.037	0.054
	H	0.073	0.067	0.072	0.084	0.085	0.076	0.076	0.075	0.059	0.091	0.09	0.855

4.2. Susceptibilidad a biocidas

4.2.1. Clorhexidina

En las placas 1, 2, 3 y 4 al inocular las diferentes cepas en los medios de cultivo con el biocida clorhexidina. Observamos que hay crecimiento de las bacterias en las cuatro placas. En la medida de la densidad óptica, en el lector de placas, las densidades que se obtuvieron eran todas mucho mayores que las densidades de los pocillos blanco. No se pudo determinar la MIC de esta manera, lo que nos daba como resultado que las cepas de *E. coli* M4V03.1, M9VB.12, M12.V.10, M14.V.04, M28.V.07, M30.V.04.1, M32.V.13.1 (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) se consideran resistentes.

- Medida de la densidad óptica en la Placa 1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M4V03.1	A	0.568	0.676	0.638	0.677	0.705	0.724	0.683	0.672	0.699	0.65	0.721	0.642
	B	0.595	0.661	0.65	0.694	0.736	0.735	0.724	0.749	0.743	0.712	0.759	0.823
	C	0.411	0.594	0.591	0.269	0.31	0.316	0.312	0.324	0.339	0.376	0.427	0.435
	D	0.294	0.396	0.432	0.527	0.641	0.601	0.221	0.291	0.241	0.251	0.282	0.297
M9VB.12	E	0.467	0.769	0.884	0.743	0.857	0.796	0.804	0.92	0.898	0.835	0.919	0.701
	F	0.529	0.752	0.831	0.777	0.877	0.884	0.869	0.901	0.886	0.753	0.871	0.795
	G	0.428	0.522	0.566	0.218	0.266	0.265	0.273	0.272	0.3	0.313	0.346	0.365
	H	0.227	0.211	0.269	0.392	0.463	0.396	0.154	0.173	0.143	0.177	0.193	0.209

- Medida de la densidad óptica en la Placa 2

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M12.V.10	A	1.045	0.942	0.78	0.699	0.666	0.67	0.672	0.633	0.696	0.668	0.738	0.694
	B	1.163	0.946	0.803	0.716	0.696	0.673	0.669	0.682	0.712	0.72	0.761	0.771
	C	0.928	0.842	0.693	0.168	0.168	0.194	0.205	0.209	0.288	0.333	0.386	0.404
	D	0.666	0.487	0.418	0.638	0.619	0.554	0.16	0.184	0.192	0.204	0.228	0.265
M14.V.04	E	1.174	0.96	0.813	0.68	0.66	0.689	0.67	0.679	0.715	0.727	0.762	0.721
	F	1.25	0.98	0.838	0.762	0.721	0.717	0.71	0.732	0.762	0.749	0.793	0.733
	G	1.013	0.841	0.724	0.155	0.172	0.185	0.196	0.214	0.216	0.275	0.314	0.338
	H	0.847	0.645	0.425	0.521	0.462	0.481	0.119	0.127	0.117	0.158	0.164	0.477

- Medida de la densidad óptica en la Placa 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M28.V.07	A	0.601	0.691	0.74	0.738	0.787	0.798	0.786	0.787	0.792	0.782	0.835	0.83
	B	0.572	0.647	0.703	0.712	0.755	0.795	0.798	0.813	0.844	0.887	0.954	0.917
	C	0.658	0.693	0.709	0.521	0.585	0.527	0.381	0.38	0.407	0.451	0.497	0.545
	D	0.377	0.461	0.475	0.673	0.717	0.818	0.207	0.206	0.235	0.231	0.239	0.283
M30.V.04.1	E	0.118	0.186	0.21	0.359	0.289	0.315	0.333	0.333	0.564	0.352	0.38	0.394
	F	0.111	0.161	0.44	0.247	0.293	0.656	0.353	0.36	0.388	0.499	0.526	0.566
	G	0.121	0.172	0.188	0.211	0.275	0.279	0.322	0.286	0.285	0.294	0.335	0.371
	H	0.172	0.177	0.205	0.312	0.34	0.346	0.177	0.132	0.148	0.178	0.212	0.226

- Medida de la densidad óptica en la Placa 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M32.V.13.1	A	0.796	0.783	0.944	0.993	0.834	0.791	0.898	0.799	0.821	0.972	0.796	0.985
	B	1.262	0.897	0.948	1.032	1.17	0.99	0.828	0.833	0.867	0.744	0.778	0.849
	C	0.297	0.334	0.327	0.307	0.321	0.325	0.349	0.366	0.342	0.457	0.44	0.426
	D	0.609	0.574	0.571	0.818	1.286	1.335	0.067	0.07	0.067	0.064	0.065	0.073
	E	0.041	0.038	0.031	0.037	0.037	0.037	0.039	0.042	0.048	0.039	0.042	0.039
	F	0.04	0.036	0.038	0.039	0.039	0.038	0.038	0.038	0.041	0.046	0.038	0.033
	G	0.039	0.038	0.044	0.043	0.039	0.041	0.042	0.038	0.042	0.043	0.044	0.040
	H	0.063	0.06	0.072	0.072	0.078	0.079	0.07	0.033	0.065	0.07	0.07	0.072

- Medida de la densidad óptica en la Placa 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.1	A	0.51	0.558	0.571	0.548	0.609	0.587	0.583	0.58	0.615	0.594	0.55	0.53
	B	0.222	0.173	0.145	0.13	0.137	0.165	0.154	0.169	0.189	0.184	0.211	0.245
	C	0.17	0.127	0.103	0.089	0.108	0.134	0.15	0.165	0.177	0.221	0.233	0.24
	D	0.393	0.325	0.298	0.492	0.503	0.51	0.139	0.147	0.157	0.156	0.157	0.158
M33.V.01.2	E	0.524	0.393	0.338	0.283	0.276	0.278	0.346	0.548	0.325	0.326	0.341	0.371
	F	0.513	0.36	0.344	0.272	0.251	0.278	0.292	0.398	0.322	0.265	0.255	0.278
	G	0.181	0.147	0.136	0.137	0.144	0.168	0.201	0.195	0.199	0.236	0.272	0.258
	H	0.576	0.408	0.317	0.453	0.42	0.417	0.107	0.082	0.082	0.117	0.118	0.433

M33.V.1: esta cepa mostró sensibilidad a la clorhexidina dando una MIC de 1.56 µg/ml, dicha concentración se considera baja por lo tanto la cepa *E. coli* M33.V.1 es sensible a la clorhexidina.

M33.V.01.2: aunque en este caso, las densidades ópticas de las concentraciones a partir de la concentración 6.25 µg/ml se acerca mucho al valor de la densidad del blanco, en las concentraciones de 100 y 200 µg/ml, las densidades aumentan y se veían todos los pocillos turbios. Así que, esta cepa resulta resistente a la clorhexidina.

- Medida de la densidad óptica en la Placa 6.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.01.5	A	0.512	0.53	0.517	0.587	0.599	0.572	0.473	0.537	0.55	0.641	0.568	0.641
	B	0.394	0.402	0.402	0.445	0.444	0.469	0.546	0.544	0.59	0.399	0.301	0.319
	C	0.217	0.22	0.217	0.237	0.244	0.253	0.289	0.312	0.317	0.38	0.369	0.358
	D	0.421	0.393	0.414	0.751	0.793	0.813	0.116	0.125	0.124	0.127	0.125	0.125
M33.V.04.1	E	0.236	0.255	0.267	0.266	0.281	0.304	0.322	0.341	0.356	0.351	0.34	0.32
	F	0.254	0.25	0.275	0.258	0.275	0.285	0.239	0.243	0.258	0.268	0.267	0.244
	G	0.178	0.192	0.178	0.179	0.192	0.191	0.211	0.222	0.219	0.32	0.3	0.307
	H	0.539	0.571	0.599	0.887	0.876	0.9	0.078	0.077	0.06	0.088	0.083	0.09

Las cepas M33.V.01.5 y M33.V.04.1 se muestran resistentes a la clorhexidina. Las densidades ópticas son mucho mayores que las de los pocillos blanco y, además, había presencia de turbidez en todos los pocillos.

4.2.2. Cloruro de benzalconio

Siguiendo la misma estrategia de los otros biocidas, las cepas de *E. coli* M4V03.1, M9VB.12, M12.V.10, M14.V.04, M28.V.07, M30.V.04.1, M32.V.13.1, M33.V.01.2, M33.V.01.5 y M33.V.04.1 son resistentes mientras que la cepa *E. coli* M33.V.1 es sensible a cloruro de benzalconio

- Medida de la densidad óptica en la Placa 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M4V03.1	A	0.614	0.721	0.639	0.78	0.757	0.775	0.732	0.755	0.768	0.734	0.809	0.787
	B	0.567	0.665	0.71	0.628	0.651	0.688	0.6	0.66	0.662	0.363	0.41	0.442
	C	0.185	0.33	0.291	0.326	0.36	0.372	0.435	0.481	0.495	0.582	0.618	0.658
	D	0.411	0.532	0.548	0.507	0.554	0.565	0.188	0.219	0.21	0.205	0.21	0.246
M9VB.12	E	0.51	0.697	0.714	0.797	0.81	0.843	0.791	0.819	0.844	0.857	0.902	0.808
	F	0.632	0.813	0.761	0.682	0.666	0.824	0.611	0.641	0.651	0.441	0.469	0.472
	G	0.246	0.274	0.282	0.339	0.397	0.375	0.481	0.442	0.463	0.558	0.61	0.649
	H	0.393	0.463	0.462	0.408	0.446	0.422	0.138	0.152	0.131	0.168	0.453	0.208

- Medida de la densidad óptica en la Placa 2.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M12.V.10	A	0.834	0.963	1.071	1.054	1.071	1.138	1.113	1.106	1.168	1.118	1.135	1.051
	B	1.059	1.017	1.178	1.017	1.029	1.03	0.983	1.038	1.042	0.37	0.375	0.38
	C	0.223	0.247	0.36	0.521	0.523	0.548	0.836	0.922	0.896	0.622	0.606	0.601
	D	0.347	0.403	0.417	0.358	0.385	0.42	0.142	0.168	0.18	0.186	0.195	0.195
M14.V.04	E	1.013	1.037	1.217	1.188	1.161	1.187	1.202	1.229	1.241	1.259	1.256	1.229
	F	0.976	1.05	1.227	1.048	1.047	1.092	0.992	1.046	1.073	0.37	0.331	0.338
	G	0.218	0.307	0.282	0.359	0.347	0.368	0.424	0.563	0.603	0.453	0.477	0.483
	H	0.321	0.35	0.327	0.287	0.328	0.112	0.726	0.096	0.09	0.102	1.117	0.11

- Medida de la densidad óptica en la Placa 3.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M28.V.07	A	1.061	1.075	1.059	1.087	1.1	1.108	1.124	1.111	1.163	1.131	1.123	1.067
	B	1.187	1.168	1.173	1.041	1.013	1.065	0.878	0.864	0.897	0.331	0.335	0.336
	C	0.25	0.191	0.269	0.392	0.392	0.422	0.663	0.699	0.704	0.528	0.536	0.515
	D	0.264	0.307	0.342	0.278	0.298	0.332	0.137	0.153	0.16	0.666	0.181	0.189
M30.V.04.1	E	1.066	1.032	1.036	1.074	1.058	1.109	1.068	1.116	1.072	1.146	1.136	1.182
	F	1.202	1.099	1.083	1.008	0.957	1.012	0.51	0.51	0.595	0.344	0.31	0.314
	G	0.203	0.21	0.216	0.348	0.356	0.337	0.337	0.355	0.36	0.399	0.432	0.415
	H	0.271	0.301	0.299	0.261	0.227	0.258	0.09	0.092	0.074	0.098	0.958	0.102

- Medida de la densidad óptica en la Placa 4.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M32.V.13.1	A	0,719	0,703	0,711	0,726	0,708	0,736	0,699	0,691	0,706	1,11	0,726	0,756
	B	0,983	0,851	0,931	0,566	0,554	0,539	0,422	0,441	0,43	0,196	0,21	0,199
	C	0,17	0,175	0,181	0,31	0,293	0,28	0,408	0,396	0,415	0,431	0,426	0,414
	D	0,268	0,301	0,264	0,268	0,289	0,293	0,066	0,081	0,087	0,075	0,075	0,081
	E	0,037	0,046	0,035	0,021	0,017	0,052	0,036	0,041	0,048	0,042	0,042	0,044
	F	0,038	0,039	0,041	0,042	0,037	0,038	0,037	0,037	0,036	0,039	0,031	0,029
	G	0,043	0,042	0,047	0,039	0,047	0,041	0,051	0,048	0,046	0,042	0,042	0,051
	H	0,055	0,056	0,072	0,08	0,087	0,088	0,073	0,079	0,075	0,106	0,104	0,097

- Medida de la densidad óptica en la Placa 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
M33.V.1	A		0,5	0,559	0,477	0,511	0,506	0,528	0,481	0,489	0,488	0,489	0,494	0,486
	B		0,116	0,171	0,232	0,131	0,143	0,151	0,26	0,175	0,225	0,23	0,207	0,226
	C		0,117	0,175	0,225	0,257	0,287	0,312	0,396	0,42	0,368	0,624	0,553	0,491
	D		0,338	0,394	0,397	0,345	0,335	0,361	0,114	0,128	0,128	0,125	0,123	0,117
M33.V.01.2	E		0,345	0,518	0,757	0,714	0,693	0,716	0,726	0,733	0,753	0,738	0,695	0,718
	F		0,273	0,42	0,59	0,319	0,309	0,335	0,349	0,359	0,377	0,335	0,318	0,321
	G		0,17	0,297	0,433	0,595	0,581	0,573	0,714	0,715	0,704	0,455	0,49	0,452
	H		0,357	0,373	0,356	0,301	0,321	0,327	0,078	0,083	0,077	0,098	0,088	0,097

- Medida de la densidad óptica en la Placa 6.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M33.V.01.5	A	0.937	0.931	0.948	0.963	0.982	0.95	0.931	0.943	0.967	0.822	0.889	0.872
	B	0.917	0.838	0.809	0.68	0.676	0.677	0.535	0.539	0.582	0.337	0.335	0.327
	C	0.254	0.266	0.269	0.471	0.539	0.505	0.794	0.768	0.761	0.576	0.57	0.52
	D	0.333	0.391	0.424	0.342	0.38	0.361	0.118	0.13	0.134	0.142	0.139	0.144
M33.V.04.1	E	0.359	0.373	0.359	0.354	0.367	0.376	0.397	0.423	0.384	0.429	0.448	0.395
	F	0.342	0.329	0.329	0.333	0.341	0.355	0.303	0.32	0.34	0.345	0.328	0.293
	G	0.266	0.282	0.267	0.464	0.47	0.462	0.639	0.684	0.661	0.478	0.523	0.476
	H	0.31	0.388	0.379	0.329	0.342	0.327	0.071	0.079	0.068	0.093	0.098	0.095

4.3. Selección de cepas resistentes a antibióticos y biocidas

De acuerdo con los resultados de susceptibilidad a antibióticos y biocidas, en la siguiente tabla se muestra el perfil de susceptibilidad de cada una de las cepas a los diferentes agentes antimicrobianos.

Cepas	Amp	Tet	CM	Cip	Ery	CHX	BZ
<i>E. coli</i> M4V03.1	R	S	R	S	R	R	R
<i>E. coli</i> M9VB.12	R	R	R	S	R	R	R
<i>E. coli</i> M12.V.10	R	S	R	S	R	R	R
<i>E. coli</i> M14.V.04	R	S	S	S	R	R	R

<i>E. coli</i> M28.V.07	R	S	S	S	R	R	R
<i>E. coli</i> M30.V.04.1	S	R	S	S	R	R	R
<i>E. coli</i> M32.V.13.1	S	R	S	S	R	R	R
<i>E. coli</i> M33.V.1	S	S	S	R	R	S	S
<i>E. coli</i> M33.V.01.2	R	S	S	R	R	S	R
<i>E. coli</i> M33.V.01.5	R	R	S	R	R	R	R
<i>E. coli</i> M33.V.04.1	R	R	S	R	R	R	R

Amp, ampicilina; BZ, benzalconio; CHX, clorhexidina; Cip, ciprofloxacino; CM, cloranfenicol; Ery, eritromicina; Tet, tetraciclina.

R, resistente; S, sensible.

5. DISCUSIÓN

Un matadero resulta ser un ambiente idóneo para el crecimiento y propagación de microorganismos zoonóticos. Esto tiene como consecuencia la propagación y diseminación de microorganismos resistentes que contaminan las diferentes superficies, maquinaria, aguas residuales y los productos cárnicos finales (Lavilla Lerma et al., 2014).

Al ser bastante usados los antimicrobianos en la industria, en lo que se refiere a limpieza y desinfección, hace que la supervivencia de bacterias represente un potencial peligro para la seguridad en la industria alimentaria. Muchos son los

factores que pueden hacer que el efecto del antimicrobiano sea inferior al necesario, como puede ser materia que actué como protectora (Lavilla Lerma et al., 2013). Estos pueden favorecer la adaptación de la bacteria cuando se exponga a concentraciones menores de las que son consideradas sensibles.

En la mayoría de los casos, la cepa *E.coli* M33.V.1 (cepa 8) recogida en la cortadora de la sala blanca del matadero ha sido sensible a casi todos los antibióticos y biocidas usados excepto a ciprofloxacino y eritromicina. Sin embargo, de acuerdo con Lavilla Lerma et al. (2014) en la sala de corte fue donde hubo una mayor diversidad de cepas resistentes.

Shuyu Wu et al. (2009) afirmó en su discusión que se realizó el primer estudio que evaluó la resistencia y diversidad de poblaciones de *E. coli* en la cadena de producción de un matadero exclusivo de cerdos. Hay una reducción en cuanto a la resistencia con un tratamiento previo con calor de las partes externas de la carne, ya que disminuyó el número total de *E. coli* resistentes a la tetraciclina. En el caso del aislamiento de cepas de *E. coli* de efluentes de matadero (Um et al., 2016) para tener un control de las aguas residuales de este, el antibiótico más utilizado fue la tetraciclina y se observó un nivel más alto de resistencia en estas muestras. En nuestro estudio, 5 de las 11 cepas aisladas de las diferentes zonas del matadero eran resistentes.

6. CONCLUSIÓN

El abuso de antibióticos en la clínica y biocidas en la industria alimentaria ha provocado que se cree una resistencia a varios de ellos, lo que hace que no tengan el efecto deseado cuando sea un caso de alta necesidad. Por lo tanto, los productos cárnicos que salen del matadero analizado pueden representar un reservorio importante de resistencias a varios antimicrobianos al ser vehículo de cepas de *E. coli* multirresistentes.

7. BIBLIOGRAFIA

Croxen M., J. Law R., Scholz R., Keeney K., Wlodarska M., Brett Finlay B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. CMR. 2013; 26(4): 822–880.

Amadou Diallo A. et al. Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving: slaughterhouse wastewater. *Water research*. 2013; 47: 4719-4729.

Atnafie B., Paulos D., Abera M., Tefera G., Hailu D., Kasaye S., et al. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces and contamination of carcass and various contact surfaces in abattoir and butcher shops of Hawassa, Ethiopia. *BMC*. 2017; 17: 24.

Bachrum Sudarwanto M. et al. CTX-M producing *Escherichia coli* isolated from cattle feces in Bogor slaughterhouse, Indonesia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6(7): 605–608.

Carvalho I. et al. Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* isolated from Miranda donkey (*Equus asinus*): an old problem from a new source with a different approach. *JMC*. 2017; 66: 191-202

De Puyseleir K., Puyseleir L., Dhondt H., Geens T., Braeckman L., A Morré S., et al. Evaluation of the presence and zoonotic transmission of *Chlamydia suis* in a pig slaughterhouse. *BMC*. 2014; 14: 560.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1, valid from 2017-03-10.

Faría J., Rivera Z., Gallegos B., García A. Resistencia a los antimicrobianos y concentración mínima inhibitoria (mic) de enterobacterias aisladas de leche cruda. *Revista Científica*. 1998; 7: 315-322.

González Fernández M., Marcilla de Pascual Blas A., Tauste Carrión J.R., Villa López I. Programa de autocontrol sanitario en mataderos. *Dirección General de Salud Pública*. 2010; 1.085-2002.

Haenni M. et al. Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in dominant versus subdominant enteric flora in

veal calves at slaughterhouse, France. *Veterinary Microbiology*. 2014; 171: 321–327.

H. Jones T., Muehlhauser V. Porcine adenovirus and porcine teschovirus as potential indicator viruses of fecal contamination for pork carcass processing. *International Journal of Food Microbiology*. 2017; 241: 237–243

Jabari L. Gannoun H., Khelifi E., Cayol J.J, Godon J.J., Hamdi M., et al. Bacterial ecology of abattoir wastewater treated by an anaerobic digester. *BMJ*. 2016; 47 (1): 73-84.

Kojima C., Kishimoto M., Ezaki T. Distribution of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry at a Slaughterhouse and Supermarkets in Japan. *Biocontrol Science*. 2015; 20: 179-184.

Lalak A. et. al. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Veterinary Microbiology*. 2016; 194: 69–73.

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

Lavilla Lerma L., Benomar N., W. Knapp C., Correa Galeote D., Gálvez A., Abriouel H. Diversity, Distribution and Quantification of Antibiotic Resistance Genes in Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces and Meat Products. *PLOS*. 2014; 9(12): e114252.

Lavilla Lerma L., Benomar N., Casado Muñoz M.C., Gálvez A., Abriouel H. Antibiotic Multiresistance Analysis of Mesophilic and Psychrotrophic *Pseudomonas* spp. Isolated from Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces throughout the Meat Production Process. *AEM*. 2014; 80: 6792-6806.

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

Marotta F., Garofolo G. , Di Donato G., Aprea G. , Platone I. , Cianciavicchia S. . Population Diversity of *Campylobacter jejuni* in Poultry and Its Dynamic of Contamination in Chicken Meat. *Biomed Res -int*. 2015; 859845.

McEvoy J.M., Doherty A.M., Sheridan J.J., Thomson-Carter F.M., Garvey P., McGuire L., Blair I.S., McDowell D.A. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *JAM*. 2003;95(2):256-66.

Michele Um M. et al. Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health. *Water Research*. 2016; 88: 30-38

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. BIOCIDAS.

Mirón Hernández A. Riesgo biológico: prevención en mataderos. NTP. 2001.

Møretrø T. , Schirmer B., Heir E., Fagerlund A., Hjemli P. , Langsrud S. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 2017; 241:215–224.

Pastor García E., Eiros Bouza J.M., Mayo Iscar A., Bachiller M.R. Consumption of Antibiotics and Resistance to Bacteria. *Elsevier*. 2005; 35:167-8

Reyes M., Durán C., Prado J. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E coli productoras* de Shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. *Rev. Mèd Chile*. 2004; 132: 1211-1216.

Stephens C.M., Adams-Sapper S., Sekhon M., Johnson J.R., Riley L.W. Genomic Analysis of Factors Associated with Low Prevalence of Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 95 Strains. *MSphere*. 2017; 2(2).

Tanih N., Sekwadi E., Ndip R., Bessong B.O. Detection of Pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from Cattle and Pigs Slaughtered in Abattoirs in Vhembe District, South Africa. *SWJ*. 2015; 2015: 195972

Teshager T., Herrero I.A., Porrero M.C., Garde J., Moreno M.A., Domínguez L. Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; 15: 137–142

Ungaretti Haberbeck L., Wang X. , Michiels C., Devlieghere F., Uyttendaele M., H. Geeraerd A. Cross-protection between controlled acid-adaptation and thermal inactivation for 48 *Escherichia coli* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2017; 241:206–214

Vipotnik Z., Rodríguez A. , Rodrigues P. *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *International Journal of Food Microbiology*. 2017; 241: 244–251.

Wu S., Dalsgaard A., Vieira A.R., Emborg H.D., B. JensenL. Prevalence of tetracycline resistance and genotypic analysis of populations of *Escherichia coli* from animals, carcasses and cuts processed at a pig slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; 135: 254–259.

Zou L.,Meng J., McDermott P., Wang F.,Yang Q., Cao G., Hoffmann M., Zhao S. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. *BSAC*. 2014; 69 (10): 2644-2649.