

Análisis de la diversidad de resistomas y virulomas en
un matadero a lo largo de la cadena de producción de
la carne



Universidad de Jaén

Memoria para optar al grado de Doctor

Guillermo Campos Calero

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

2021

Análisis de la diversidad de resistomas y virulomas en un matadero a lo largo de la cadena de producción de la carne

Memoria para optar al grado de Doctor
Jaén, 2021

Fdo: Guillermo Campos Calero
Aspirante al Grado de Doctor

Las Directoras del trabajo:

Fdo: Nabil Benomar El Bakali

Fdo: Natacha Caballero Gómez

Fdo: Hikmate Abriouel Hayani

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

La profesora D^a. Hikmate Abriouel Hayani, el profesor D. Nabil Benomar El Bakali y la Dra. Natacha Caballero Gómez, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

CERTIFICAN:

Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: “Análisis de la diversidad de resistomas y virulomas en un matadero a lo largo de la cadena de producción de la carne” presentado por D. Guillermo Campos Calero ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo así mismo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor.

Jaén, Mayo de 2021

Fdo: Nabil Benomar El Bakali

Fdo: Natacha Caballero Gómez

Fdo: Hikmate Abriouel Hayani

Este trabajo ha sido subvencionado por las Estructuras de Investigación EI_BIO01_2017 y EI_BIO1_2019.

ÍNDICE

Resumen	3
Introducción	9
1.- La producción de alimentos cárnicos	9
1.1.- La transformación de los alimentos cárnicos.....	9
1.2.- Los microorganismos en los alimentos cárnicos	13
2.- Los microorganismos relevantes en los alimentos cárnicos	24
2.1. <i>Listeria</i>	24
2.2. <i>Escherichia coli</i>	25
2.3. Las bacterias del ácido láctico (BAL).....	27
2.4. <i>Enterococcus</i>	29
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.6. <i>Pseudomonas</i>	35
3.- Los antibióticos	37
3.1. Generalidades.....	37
3.2. Clasificación.....	40
3.3. Antibióticos de uso animal.....	43
4.- La resistencia bacteriana a los antibióticos en la cadena de producción de carne	49
4.1. Mecanismos de Resistencia bacteriana.....	51
4.2. Diseminación de la Resistencia a antibióticos.....	54
4.3. Medidas para reducir la Resistencia a antibióticos.....	57

5.- La virulencia.....	60
5.1. Factores de virulencia.....	60
Objetivos.....	73
Trabajo experimental y resultados.....	77
<i>Artículo 1</i>	81
Descifrando la diversidad de resistomas y virulomas en un matadero porcino y sus productos cárnicos a lo largo de la Cadena de producción de la carne.	
Deciphering Resistome and Virulome Diversity in a Porcine Slaughterhouse and Pork Products Through Its Production Chain.	
<i>Artículo 2</i>	97
Mapeo <i>in silico</i> de comunidades microbianas y respuestas al estrés en un matadero porcino y sus productos a lo largo de la cadena de producción de la carne, y la eficacia del desinfectante HLE.	
<i>In silico</i> mapping of microbial communities and stress responses in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain, and the efficacy of HLE disinfectant.	
Discusión general.....	111
Conclusiones.....	127
Referencias bibliográficas.....	131

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Agr: Alelos reguladores de genes accesorios.

AMR: Antimicrobial resistance – Resistencia a los antimicrobianos.

APC: Antibióticos usados como promotores del crecimiento.

ANOVA: Analysis of variance – Análisis de la varianza.

ARGs: Antibiotic resistance genes - Genes de resistencia a los antibióticos.

ARB: Antimicrobial resistant bacteria – Bacteria resistente a los antimicrobianos.

ARN: Ácido ribonucleico.

Aw: Actividad del agua.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool – Herramienta básica de búsqueda de alineación local.

CARD's: Comprehensive antibiotic resistance database – Base de datos exhaustiva de resistencias a antibióticos.

CDDEP: Center for disease dynamics, economics and policy – Centro de economía y políticas de dinámica de enfermedades.

CDSs: Coding DNA sequences – Código de secuencias de ADN.

CFU: Colony-forming unit – Unidad formadora de colonias (UFC)

COG: Clusters of orthologous groups of proteins – clúster de grupos de proteínas ortólogas.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EFSA: European Food Safety Authority – Autoridad europea de seguridad alimentaria.

EHEC: Cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas.

EMA: European Medicines Agency – Agencia europea del medicamento.

ERV: Enterococos resistentes a la vancomicina.

ESVAC: European surveillance of veterinary antimicrobial consumption – Vigilancia europea del consumo de antimicrobianos.

ETA: Enfermedad de transmisión alimentaria.

FAO: Food and agriculture organization of the United Nations – Organización de las Naciones

Unidas para la alimentación y agricultura.

FDA: Food and drugs administration – Administración de alimentos y medicamentos de los EE.UU.

GRAs: Generalmente reconocidas como seguras.

GO: Gene ontology – Ontología génica.

HLE: Desinfectante basado en sustancias naturales.

ICMSF: International comisión on microbiological specifications for foods – Comisión internacional de especificaciones microbiológicas en alimentos.

KEGG: Kyoto encyclopaedia of genes and genomes – Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto.

LAB: Lactic acid bacteria – Bacteria ácido láctica (BAL).

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

PERVs: Porcine endogenous retroviruses – Retrovirus endógenos porcinos.

PCU: Population correction unit – Unidad de corrección por población.

QPS: Qualified presumption of security – Presunción cualificada de seguridad.

SCENIHR: Scientific committee on emerging and newly identified health risk – Comité científico de la Comisión Europea sobre riesgos emergentes para la salud.

SE: Enterotoxinas estafilocócicas.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism – Polimorfismo de un solo nucleótido.

STEC/VTEC: Cepas de *Escherichia coli* serotoxigénicas o verotoxigénicas.

Stx: Toxinas shiga.

SUH: Síndrome urémico hemolítico.

VFDB: Virulence factors of bacterial pathogens – Factores de virulencia de bacterias patógenas.

VRGs: Virulence genes – Genes de virulencia.

VT: Verotoxinas.

WHO – World Health Organization – Organización mundial de salud (OMS)

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno ancestral y que ocurre de forma natural, no obstante este fenómeno ha aumentado de forma drástica en los últimos años debido al uso indiscriminado de los mismos, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

Determinar las poblaciones bacterianas presentes en las distintas fases de producción de los alimentos y las resistencias a los antibióticos que han adquirido estas bacterias se antoja fundamental para garantizar la seguridad alimentaria. En este sentido los mataderos, al ser un primer eslabón que une las granjas y la industria dentro de la cadena alimentaria, suponen una frontera crucial dónde debemos actuar para garantizar la inocuidad de los alimentos cárnicos. Para ello, es fundamental conocer la ecología microbiana del matadero, por lo que procedimos a determinar la diversidad microbiana presente en las diferentes áreas de producción y superficies de productos de un matadero de porcino de la provincia de Jaén y a continuación determinar patrones de resistoma y viruloma, con el fin de monitorear la posible contaminación a lo largo de la cadena de producción alimentaria. Por medio de métodos de cultivo en medios específicos se revelaron altos niveles de contaminación microbiana, correspondientes a bacterias mesófilas y patogénicas en superficies tanto de animales como de áreas de procesado, principalmente en el área de anestesia (AA y AS), seguido del área de chamuscado y flagelado (FA y FS) y también en los productos finales. Para evaluar el riesgo potencial de resistencia a antibióticos y determinantes de virulencia, se empleó la secuenciación masiva de ADN metagenómico de aislados obtenidos de diferentes áreas/productos, revelando una alta diversidad y abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs): 55–62 genes en el área de anestesia (AA y AS) y 35–40 en la zona de recepción animal (MA y MS). Por otro lado, el área de chamuscado y flagelado (FA y FS) mostró menor abundancia de ARGs (1–6), lo cual indica que el proceso de escaldado y depilado (una zona intermedia entre las zonas de anestesia y chamuscado y flagelado) redujeron significativamente la carga bacteriana en 1–3 log₁₀ y el resistoma. La alta prevalencia de genes codificantes de enzimas inactivadoras de antibióticos en las zonas de recepción de animales (60–65%) y anestesia (56%) estaba

principalmente representada por resistencia a aminoglucósidos (46–51%) y a lincosamidas (14–19%), las cuales no mostraron presiones selectivas por antibióticos comúnmente utilizados en terapia porcina (i.e., tetraciclinas y betalactámicos). Al contrario que en el caso de los ARGs, se detectó un número mayor de genes de resistencia a virulencia después del destripamiento en algunos productos, como por ejemplo los riñones, lo que puede evidenciar una contaminación cruzada o unas prácticas de higiene insuficientes. Se identificaron más de 19 determinantes generales de virulencia principalmente adherencia, bombas de expulsión, quimiotaxis, invasión y motilidad en algunos productos. Por otro lado, se hallaron determinantes del mecanismo de evasión a la respuesta inmune en casi todas las muestras analizadas desde el principio del proceso, siendo el área de anestesia la que mostró mayores cantidades. Por lo expuesto, se concluye que hay dos fuentes principales de contaminación en los mataderos porcinos: los microorganismos presentes en la piel de los animales, que prevalecen en las primeras fases de procesado, y los que se liberan del interior de éstos en el proceso de evisceración. Por tanto, centrar las medidas de control en mejorar los procedimientos de limpieza y desinfección en estas áreas de foco de contaminación estableciendo desinfecciones intermedias durante la jornada de producción, puede reducir los riesgos para la seguridad alimentaria y la salud de consumidor, ya que los determinantes de virulencia y resistencia a antibióticos presentes en estos puntos pueden propagarse a los productos finales y al medio ambiente. Además, los ARGs y determinantes de virulencia pueden exacerbar los tratamientos de patógenos

Una vez conocida la prevalencia de ARGs y de diversos factores de virulencia consideramos interesante utilizar la secuenciación metagenómica para entender la expansión de microbios a nivel ecológico y sus genes. En otro estudio, se tomaron muestras de productos y alrededores a lo largo de un proceso de matanza porcina. Los estudios metagenómicos revelaron una alta diversidad de comunidad microbiana en el matadero y productos porcinos, en zonas que comprendían desde la recepción de los animales vivos hasta la venta de los productos finales. Las bacterias mostraron mayor prevalencia en las primeras

zonas, tales como recepción y anestesia de los animales, mientras que los virus de ADN predominaron en la zona de chamuscado y flagelado, producto final y expedición. Los datos revelaron el predominio de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria*, seguidos de *Actinobacteria*, con un claro cambio en la abundancia relativa de bacterias del ácido láctico (principalmente *Lactobacillus* sp.) desde los primeros pasos de la matanza hacia *Proteobacteria* y virus, sugiriendo que ocurren composiciones de comunidades microbianas específicas de sitios en el matadero. El oncovirus porcino tipo C fue el principal virus encontrado en el matadero, el cual provoca enfermedades malignas en animales y humanos. Por tanto, para garantizar la calidad alimentaria en los mataderos, es crucial desarrollar un mejor descifrado ecológico y estrategias de adaptación. El análisis de genes funcionales reveló una alta abundancia de diversos genes asociados al estrés, especialmente en las primeras zonas (superficies animales y ambientales de la zona de recepción con 57.710 y 40.806 genes, respectivamente); los genes de respuesta SOS fueron los más prevalentes, posiblemente asociados a cambios genómicos responsables de la formación de biopelícula, respuesta estricta, choque térmico, producción antimicrobiana y respuesta antimicrobiana. La presencia de varios genes de resistencia a los antibióticos sugiere la ocurrencia de transferencia horizontal de genes, aumentando así la probabilidad de selección de resistencia en patógenos humanos. Estos hallazgos son muy preocupantes, y llevan a proponer la focalización de las medidas de control y el establecimiento de estrategias de desinfección adecuadas para prevenir la expansión de genes y contaminantes microbianos (bacterias y virus) de las superficies animales a la cadena alimentaria y al medioambiente, lo cual ha sido logrado mediante la aplicación del desinfectante HLE combinado con una limpieza previa con detergente, disminuyendo así la contaminación microbiana y su expansión en comparación con los productos de uso habitual en la industria.

INTRODUCCIÓN

1. La producción de los alimentos cárnicos

Bajo la denominación, tremendamente genérica, de alimento cárnico podemos incluir cualquier alimento que esté compuesto en su mayor parte por carne. Según la Real Academia Española de la Lengua podemos definir carne como un “alimento consistente en todo o parte del cuerpo de un animal de la tierra o del aire, en contraposición a la comida de pescados y mariscos”. Afinando algo más la definición decimos que carne es la parte blanda entre la piel y el hueso (principalmente músculo) de los animales y de las aves (Latham, 2002), no obstante, esta definición puede resultar demasiado genérica y no tiene en cuenta el proceso de transformación del músculo en carne. En una definición más acorde con los procedimientos de obtención de la carne en la actualidad podemos definir la carne como el músculo obtenido de un animal tras el sangrado, pelado y deshuesado; y tras un almacenamiento suficiente como para que ocurran los procesos fisicoquímicos que otorgan al músculo las características organolépticas adecuadas para poder llamarlo carne (Ouali et al., 2006).

Así pues, la producción de los alimentos cárnicos abarca todo proceso que intervenga en la obtención, preparación o conservación de los alimentos cuyo origen sea la carne animal.

1.1. La transformación de los alimentos cárnicos

Casi todos los animales consiguen sus alimentos, algunos incluso los almacenan para un consumo posterior, pero ninguno a excepción del ser humano los cultiva o procesa. Durante su evolución los seres humanos aprendieron a cultivar los alimentos y posteriormente desarrollaron procesos para poder conservarlos o mejorar sus características organolépticas (Latham, 2002). Así pues, el procesado de alimentos en general, y de la carne en particular, ha evolucionado a través de las diferentes épocas, desde el uso del

fuego para asar carnes hace 1,8 millones de años, pasando por el desarrollo de varios métodos como el cocinado, fraccionamiento, conservación usando calor, congelación y secado (Knorr & Agustin, 2020) hasta la emergente ciencia de la carne cultivada en laboratorio. En relación a la producción de carne cultivada cabe mencionar que estudios recientes apuntan a que este último avance se enfrenta a un impedimento significativo para la viabilidad del mercado, debido a las lagunas de conocimientos fundamentales en la producción de tejidos cárnicos realistas y a la dificultad de definir la base molecular para obtener los atributos deseables de la calidad de la carne, como el sabor y la textura (Shengyong & Kurisawa, 2021). Es decir, para conseguir esos procesos fisicoquímicos que en la extracción tradicional de la carne ocurren de forma natural durante un adecuado almacenamiento.

Podemos decir que la transformación de los alimentos es algo que se realiza de forma cotidiana en la preparación de comidas, como la cocción, sin embargo la terminología “transformación de alimentos” debe conllevar la aplicación de principios científicos y tecnológicos que ocasionen cambios de forma predecible y controlada y que ayuden a la conservación de los alimentos, retardando o deteniendo el proceso natural de deterioro; o que provoquen alteraciones deseables en la calidad organoléptica de los mismos (Fellows, 2004).

A grandes rasgos se distinguen dos categorías en la transformación de alimentos:

1. La elaboración primaria, que sirve para estabilizar los alimentos después de la recolección y, a veces, a transformarlos para un mejor almacenamiento. En relación a la carne en este punto, según la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía, se incluye la ganadería, transporte de animales vivos hasta el matadero y la caza.

2. La elaboración secundaria, en la cual los alimentos frescos o los productos de la elaboración primaria son transformados en una amplia gama de productos derivados.

Enfocándonos en la producción cárnica, la producción primaria (principalmente la ganadería) constituye la base del desarrollo de sociedades enteras y en regiones específicas, algunas tan grandes como continentes, es la principal o única actividad económica, que influye en el modo de vida, la cultura y las tradiciones (Paredi et al., 2012).

La transformación secundaria de productos cárnicos es tremendamente variable, pero siempre se parte de un primer paso, que aunque pueda parecer exento de complejidad o relevancia, es uno de los aspectos más determinantes en la producción de carne, que es la transformación del músculo en carne, es decir, la conversión de tejidos animales vivos en un producto cárnico finalmente comestible (Paredi et al., 2012). Los pasos realizados desde el sacrificio de los animales, incluso de las operaciones previas al sacrificio, hasta la obtención de la carne son fundamentales para que esta tenga las características organolépticas deseadas por el consumidor.

Por ejemplo, un mal sangrado por un corte incompleto de vasos sanguíneos provoca que quede retenida gran cantidad de sangre en los tejidos, ocasionando que la carne se eche a perder antes de tiempo. Además, si se demora el proceso de desangrado después del aturdimiento, se aumenta la presión sanguínea y la ruptura de vasos, produciéndose hemorragias musculares. Esta sangre adicional en los tejidos contribuye a la rápida descomposición de la carne y a su consiguiente falta de aprovechamiento (FAO, 2001).

Otro proceso fundamental en la obtención de la carne es el almacenamiento a baja temperatura ya que es un requisito previo para el desarrollo de las principales cualidades alimenticias, incluidas la ternura y el sabor. Ahora bien,

hay que establecer un tiempo de almacenamiento adecuado ya que aumentar la duración del almacenamiento puede ser rentable para la ternura y el sabor, pero tendrá un efecto bastante perjudicial sobre la jugosidad y el color (Ouali et al., 2006).

Una vez obtenida la carne esta puede sufrir innumerables transformaciones dependiendo de las zonas dónde se elabore el producto y de sus preferencias de consumo o culturales, por ejemplo, en muchos países, especialmente en España, Francia, Italia y Portugal, la carne fresca de cerdo se utiliza principalmente para la producción de jamón curado y cocido, y otros embutidos salados que deben conservarse a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo (Paredi et al., 2012). Otro de los procesos más básicos es el cocinado, las condiciones de cocción son esenciales en el desarrollo del sabor a través de la reacción de Maillard que tiene lugar, al calentar, entre los carbohidratos y las proteínas y sus derivados (Ouali et al., 2006). Además de estos ejemplos podemos encontrar otros como el ahumado, secado, maceración, etc.

Más allá de estos apuntes sobre transformaciones en búsqueda de determinadas características organolépticas o métodos de conservación, todos los transformadores de alimentos cárnicos deben garantizar productos incontaminados y carentes de riesgos para el consumidor, no sólo riesgos microbiológicos si no también riesgos físicos (esquirlas de vidrio o metal) o químicos (pesticidas) (Fellows, 2004). Entre los posibles riesgos de un alimento, la contaminación microbiana es el mayor riesgo para la seguridad alimentaria en la actualidad, y el número de afectados por alimentos contaminados por agentes biológicos aumenta cada año (Lavilla Lerma et al., 2014b).

Las fuentes de contaminación de un alimento cárnico pueden ser tremendamente variadas, teniendo una prevalencia importante la producción primaria, ya que la mayor parte de las bacterias encontradas en alimentos

cárnicos procede de la piel de los animales (Sofos, 2014). También se pueden producir contaminaciones de alimentos debido a una mala manipulación durante las diferentes etapas de su procesado, por lo que una correcta transformación de los alimentos disminuirá significativamente el riesgo de contaminación del mismo, tanto por la eliminación de riesgos provenientes de la producción primaria como por la no contaminación con otros elementos de riesgo asociados a la producción secundaria.

1.2. Los microorganismos en los alimentos cárnicos

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas —casi 1 de cada 10 habitantes— por ingerir alimentos contaminados y que 420 mueren por esta misma causa. En un estudio realizado a nivel mundial por la OMS para estimar la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), en el que se incluyeron 31 agentes alimentarios causantes de 32 enfermedades, se estimó que en 2010 estos 31 agentes (incluyendo bacterias, virus y agentes químicos) causaron 600 millones de casos de ETA. Recientes estudios estiman que aproximadamente el 90% de las enfermedades transmitidas por los alimentos en humanos son causadas únicamente por bacterias (Das et al., 2019).

Entre los diferentes alimentos, la carne es un excelente medio de crecimiento microbiano, ya que contiene nutrientes básicos que favorecen el crecimiento de microorganismos. Además, manipular la carne cruda de manera antihigiénica crea un entorno lo suficientemente propicio para el crecimiento de microorganismos (Das et al., 2019). En la Figura 1 podemos observar la proporción de brotes de enfermedades alimentarias que causan los distintos productos y cómo la carne, junto con los huevos, se presenta como uno de los principales alimentos causantes de dichos brotes.

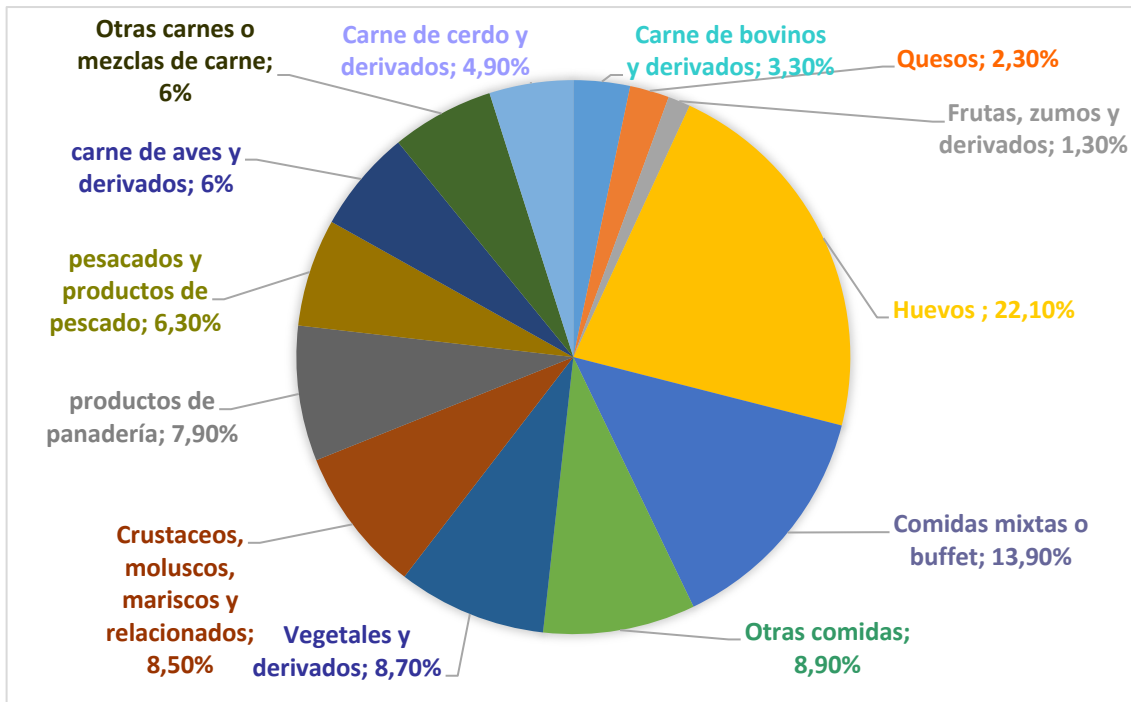


Figura 1. Distribución de enfermedades alimentarias por alimentos.

Fuente. [Modificado de *Distribution of outbreak caused by food* (EFSA, 2012; Kopper et al., 2013)].

La contaminación de la carne se puede deber, como se apuntaba anteriormente, a diferentes factores y aunque se puede considerar que el musculo de un animal sano es un tejido estéril, la contaminación está presente en las superficies externas de los animales como las pieles y en el tracto gastrointestinal, así como de forma esporádica, en un nivel bajo, dentro de los tejidos de órganos como los ganglios linfáticos (Sofos, 2014).

Detallando en que fases de producción se puede producir la contaminación biológica de la carne podemos diferenciartres grandes etapas:1) la contaminación que se produce durante las operaciones previas al sacrificio, es decir producción primaria (granja y transporte de animales), 2) durante la etapa

de producción (sacrificio y transformación) y finalmente 3) en la fase de post-producción (embalaje, almacenamiento, distribución y ventas).

En la primera de estas fases, la contaminación microbiológica se produce principalmente por contaminación fecal ya que los patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos más importantes (p. Ej., *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp.) pueden alojarse y excretarse del tracto gastrointestinal de los animales productores de alimentos (Buncic et al., 2013).

Dentro de las operaciones previas al sacrificio, es el transporte de animales de forma antihigiénica y con una alta densidad de población una de las principales fases que favorece la contaminación cruzada con patógenos (Das et al., 2019) ya que muchos de los microorganismos que pueden contaminar la carne sobreviven fácilmente en el medio ambiente.

En relación a lo expuesto en el párrafo anterior, diversos estudios han relacionado un aumento de los microorganismos viables en canales de animales sacrificados con la carga microbiana de dichos animales antes del sacrificio (Mc Evoy et al., 2000), por lo que la limpieza de los animales en granja previa al traslado al matadero, así como la ducha de los animales en el matadero antes del sacrificio podrían mejorar los índices microbiológicos de la carne obtenida.

Por otro lado, el trato inhumano de los animales durante el período previo al sacrificio, puede causar un gran estrés a estos, lo que a su vez, puede deteriorar la calidad y la seguridad de la carne (Das et al., 2019).

La excreción fecal de patógenos por los animales de granja se puede reducir mediante el uso de tratamientos antimicrobianos en los alimentos para animales, la introducción de nuevos animales solo a partir de fuentes controladas, la bioseguridad de las explotaciones ganaderas controlando el acceso higiénico a las mismas, asegurando unas condiciones de bienestar animal óptimas (manejo del estrés) y procurando un cuidado higiénico de los animales, así como

mediante el uso de prebióticos, probióticos y / o conceptos competitivos de exclusión y vacunación (Buncic et al., 2013).

En la fase de producción y principalmente en el matadero, la principal fuente de contaminación proviene de la piel, pelo o vellón de los animales. De hecho, las canales de los animales productores de carne se contaminan de forma inmediata durante el sacrificio y faenado, ya que al hacer una incisión en la piel para su eliminación el tejido subyacente, generalmente estéril, se expone al medio ambiente (Sofos, 2014). También se pueden introducir bacterias en el canal a través de las heridas punzantes realizadas tras el aturdimiento, para la extracción de la sangre (Das et al., 2019), ya que, como se apuntaba anteriormente, los patógenos entéricos que se encuentran en la carne se derivan en gran medida de la materia fecal de animales infectados (Heuvelink et al., 2001). Durante los diferentes procesos de producción se producen posibilidades de contaminación de las superficies de la carne, por exposición a bacterias ambientales o presentes en las superficies externas de los animales (Das, 2019).

Otra fuente importante de contaminación de la carne es la contaminación cruzada que puede producirse por contacto con manos contaminadas de trabajadores o equipos, o por contacto directo con canales contaminadas (Das et al., 2019). Podemos mencionar como fuentes adicionales de contaminación cruzada el entorno de procesamiento, el equipo, los utensilios y las personas (Sofos, 2014). En este sentido, estudios recientes han evidenciado que existe un riesgo potencial de contaminación cruzada a través de botas, delantales, máquinas de corte y cuchillos en las plantas procesadoras de carne, incluso en fases posteriores por medio de guantes, cuchillos, botas y pulseras (King & Yim, 2017). Esto se explica porque durante el deshuesado y corte de la canal, la contaminación de la canal externa y las superficies del equipo se esparce y distribuye en el equipo y otras superficies ambientales, así como en otras canales o cortes de carne y conduce a un ciclo de propagación de la contaminación

(Sofos, 2014). Este ciclo de propagación de la contaminación es tremendamente peligroso y es importante controlarlo mediante un proceso adecuado de desinfección de las superficies y utensilios que han estado en contacto con la carne.

Por lo tanto, un descenso en la carga microbiológica del producto se puede conseguir mediante un sacrificio y faenado higiénicos, saneamiento eficaz y el uso potencial de tratamientos de descontaminación de piel y / o canales (Buncic et al., 2013), además de controlar también la correcta limpieza y desinfección de las superficies que pueden estar en contacto con la carne durante su procesamiento y el cumplimiento estricto de las normas higiénicas por parte de los/as trabajadores/as en la industria cárnica.

En la última gran etapa de la cadena de elaboración cárnica (distribución y venta minorista), la contaminación microbiológica de la carne se puede deber a diferentes factores como el transporte (distancia y condiciones climáticas, incluida la temperatura), tipo de embalaje, o condiciones de almacenamiento (refrigeración y retención) (Das et al., 2019). La correcta gestión de las instalaciones de almacenamiento y transporte en refrigeración o congelación, así como el mantenimiento de la cadena de frío del producto, es imperativo no solo para garantizar una carne de calidad con vida útil, sino también para controlar los peligros para la seguridad de la carne, especialmente los peligros biológicos, ya que las bacterias se multiplican rápidamente a temperaturas más altas. Por otro lado, el envasado adecuado de la carne y los productos cárnicos es importante porque proporciona protección contra los efectos ambientales y disminuye el riesgo de contaminación.

En la última etapa de la cadena de elaboración de la carne y productos cárnicos, el control de patógenos en productos cárnicos a menudo se basa en un paso bactericida (por ejemplo, cocción). Además, las medidas de reducción de riesgos en esta fase incluyen la limpieza y saneamiento eficaces de todos los

locales relacionados con la carne, una cadena de frío ininterrumpida, la prevención de la contaminación cruzada durante la manipulación y / o preparación de alimentos posteriores y la educación de los consumidores sobre la higiene de los alimentos (Buncic et al., 2013).

Es importante tener en cuenta que algunos aspectos del sistema de control de la contaminación microbiológica son específicos, tanto de la etapa de la cadena de producción de la carne, cómo del patógeno a controlar. Por lo tanto, algunos patógenos en la carne y sus productos, por ejemplo, *Salmonella* sp., se controlan de manera más eficiente mediante las principales medidas aplicadas durante la producción primaria (en la granja) combinadas con la optimización de la higiene del matadero, mientras que otras, por ejemplo, *L. monocytogenes*, se controlan de manera más eficiente en las etapas de procesamiento-almacenamiento (Nørrung et al., 2009).

Una vez establecidas las principales fases de la producción de la carne en la que se puede producir una contaminación por microorganismos tenemos que diferenciar entre presencia de microorganismos e inaptitud para el consumo. La carne se considera como contaminada cuando es inaceptable según sus características organolépticas: aparición de olores o sabores desagradables, aparición de mucosidad, decoloración o cualquier otra característica que la hace indeseable para el consumidor (Lavilla Lerma et al., 2014a).

Además, se puede considerar carne no apta para consumo aquella que, pese a presentar unas características organolépticas adecuadas, tenga una carga microbiológica por encima de lo permitido por la normativa. La normativa es extremadamente variable entre regiones o países, así por ejemplo, en la Unión Europea, según el Reglamento CE 2073/2005 de la Comisión Europea se considera adecuada una media logarítmica diaria de 2,0 log UFC/cm² de bacterias del grupo *Enterobacteriaceae*, no obstante China exige para los despojos derivados de la carne importados desde España una carga

microbiológica máxima de entre 5×10^3 y 5×10^4 UFC/g para el mismo grupo de bacterias (Ministerio de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de España, 2005).

Los microorganismos patógenos más relevantes en la contaminación de la carne y productos cárnicos (Tabla 1) incluyen *Bacillus* spp. (por ejemplo, *Bacillus cereus*), *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, serotipos patógenos de *Escherichia coli*, especialmente productores de shigatoxina / cepas enterohemorrágicas (EHEC) verotoxigénicas (STEC/VTEC), *L. monocytogenes*, Serotipos de *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica*. Otras bacterias patógenas, que pueden ser o se han sugerido como potencialmente transmitidas a través de la carne, incluyen *Aeromonas*, *Arcobacter* (anteriormente *Campylobacter*), *Bacillus anthracis*, *Brucella*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter*, *Helicobacter*, *Mycobacterium*, *Plesiomonas* y *Shigella* (Sofos, 2014).

Tabla 1. Géneros de bacterias más frecuentes encontrados en carne.

Género	Tinción de Gram	Frecuencia
<i>Acinetobacter</i>	-	XX
<i>Aeromonas</i>	-	XX
<i>Alcaligenes</i>	-	X
<i>Arcobacter</i>	-	X
<i>Bacillus</i>	+	X
<i>Brochothrix</i>	+	X
<i>Campylobacter</i>	-	
<i>Carnobacterium</i>	+	X
<i>Caseobacter</i>	+	X
<i>Citrobacter</i>	-	X
<i>Clostridium</i>	+	X
<i>Corynebacterium</i>	+	X
<i>Enterobacter</i>	-	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX
<i>Erysipelothrix</i>	+	X
<i>Escherichia</i>	-	X
<i>Flavobacterium</i>	-	X

<i>Hafnia</i>	-	X
<i>Kocuria</i>	+	X
<i>Kurthia</i>	+	X
<i>Lactobacillus</i>	+	X
<i>Lactococcus</i>	+	X
<i>Leuconostoc</i>	+	X
<i>Listeria</i>	+	X
<i>Mycrobacterium</i>	+	X
<i>Micrococcus</i>	+	X
<i>Moraxella</i>	-	XX
<i>Paenibacillus</i>	+	X
<i>Pantoea</i>	-	X
<i>Pediococcus</i>	+	X
<i>Proteus</i>	-	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX
<i>Psychrobacter</i>	-	XX
<i>Salmonella</i>	-	X
<i>Serratia</i>	-	X
<i>Shewanella</i>	-	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X
<i>Vagococcus</i>	+	
<i>Weissella</i>	+	X
<i>Yersinia</i>	-	X

Nota: X = Aislados; XX = Aislados frecuentemente.

Fuente. Tabla modificada de Jay et al. (2005).

Sin embargo, aunque la carne puede contaminarse con una gran variedad de microorganismos, su deterioro lo producen sólo unos pocos de éstos, al convertirse en los microorganismos dominantes mediante una selección que se da durante el almacenamiento debido a la interacción de las comunidades microbianas. Así, la temperatura y la composición de gases durante el almacenamiento, además de la competición por los nutrientes, la adaptación al ambiente y la comunicación entre las células (por ej. *quorum sensing*) serán los principales factores que determinan el crecimiento de unos microorganismos

frente a otros con unas definidas consecuencias sobre el deterioro de la carne (Doyle & Beuchat, 2007).

A continuación, podemos ver las principales bacterias que causan enfermedades a través de los alimentos (Tabla 2).

Tabla 2. Riesgos biológicos.

Bacteria	Tipo de carne	Fuentes	Métodos de control
<i>Bacillus cereus</i>	Tenera	Suelo	Inactivación de esporas por calor; Control de temperatura (>60°C o <10°C); Control de pH y Aw; Cocinar alimentos.
	Cerdo	Animales	
	Cordero		
	Pollo		
<i>Campylobacter</i> spp.	Tenera	Animales	Inactivación celular (pasteurización); Procedimientos de sacrificio y procesado higiénicos; Irradiación; Tratamiento del agua; Prevención de la contaminación cruzada con las superficies de contacto; Higiene personal de los manipuladores de alimentos.
	Cerdo		
	Cordero		
	Pollo		
<i>Clostridium botulinum</i>	Tenera	Suelo	Inactivación de esporas; control del crecimiento celular (refrigeración); Hervido para destrucción de toxinas; nitritos en productos cárnicos pasteurizados; conservación en medio ácidos (pH < 4,6)
	Cerdo	Agua	
	Cordero	Animales	
	Pollo		
<i>Clostridium perfringens</i>	Tenera	Suelo	Inactivación de esporas (cocinado); control de crecimiento (refrigeración).
	Cerdo	Agua	
	Cordero	Animales	
	Pollo		

<i>Escherichia coli</i> (grupos patógenos)	Ternera Cerdo Cordero	Animales	Prevención de la contaminación fecal de comida o agua; inactivación celular (pasteurización o cocinado), potabilización del agua; buena higiene personal; irradiación de carne; separación de la carne cocinada de las materias primas.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Alimentos preparados de Ternera, cerdo, cordero, pollo	Agua Suelo Animales	Inactivación celular (pasteurización o cocinado); Control del crecimiento (congelación, almacenamiento en frío); re-cocinado antes de consumo; evitar alimentos de alto riesgo en poblaciones sensibles.
<i>Salmonella entérica</i>	Pollo Ternera Cerdo Cordero	Animales	Inactivar células (pasteurización, cocción); controlar el crecimiento (refrigeración); irradiación de carnes; recalentamiento de alimentos; prevención de la contaminación cruzada.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Alimentos preparados de ternera, cerdo, cordero, pollo	Humanos Entorno de procesamiento Animales	Inactivar células (pasteurización, cocción); controlar a los manipuladores de alimentos (lesiones cutáneas, forúnculos, cortes, etc.); buena higiene

			personal de los trabajadores.
<i>Yersinia</i>	Cerdo	Animales	Inactivación celular
<i>enterocolitica</i>	Pollo	Suelo	(pasteurización, cocinado);
		Agua	control del crecimiento (congelación); prevención de la contaminación cruzada.

Fuente. Tabla modificada de Sofos (2014).

Los productos cárnicos en general pueden presentar una mayor carga microbiológica debido a que se utilizan partes de animales a las que se presta una menor atención higiénica y a que, normalmente, se procede a un picado o triturado de la carne durante su elaboración. Los cortes de carne molidos o triturados, es decir los cortes no intactos, contienen unos mayores niveles de contaminación que las canales de los animales de procedencia o las superficies intactas del producto, debido a la contaminación cruzada de las cuchillas y utensilios. Además, en estos productos, la contaminación queda atrapada dentro del tejido, lo que hace que sea más difícil de eliminar durante el cocinando. Dentro de los productos cárnicos clasificados como no intactos se incluyen cortes de carne intactos que son ablandados mecánicamente o en los que se usan agujas huecas o inyectores, que se utilizan para inyectar soluciones para marinar, aromatizar, mejorar la humedad o ablandar (Sofos, 2014). Además, en la elaboración de productos cárnicos se le añaden una serie de ingredientes como especias que pueden contribuir al aumento de la carga microbiana. Sin embargo, el procesamiento de estos cortes aumenta la ternura, la jugosidad y el sabor, y hace que el uso de tales productos sea deseable (Sofos, 2014).

2.- Los microorganismos relevantes en los alimentos cárnicos

2.1. *Listeria*

Listeria incluye las especies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeriy* *L. grayi*, *L. murrayi*, y las nuevas especies *L. roucourtii* y *L. marthii* (Sofos, 2014). Sin embargo, solo *L. monocytogenes* y *L. ivanoviise* consideran virulentas. Los casos humanos de infección por *L. ivanovii* son raros, mientras que *L. monocytogenes* es un patógeno importante transmitido por los alimentos (Zhang et al., 2007). De las 13 serovariedades conocidas de *L. monocytogenes*, la única especie patógena humana, 1/2a, 1/2b y 4b, representan el 95% de las aisladas en humanos, con cepas de la serovariedad 4b involucradas en 33-50% de los casos humanos en todo el mundo (Sofos, 2014). *Listeria monocytogenes* es un patógeno omnipresente intracelular transmitido por los alimentos que causa listeriosis en animales y humanos, se adapta fácilmente a las condiciones del tracto gastrointestinal humano y tolera los cambios adversos como la acidez, la bilis, la osmolaridad y los péptidos antimicrobianos (Kannan et al., 2020).

Listeria es un bacilo corto, de 0.4-0.5 μm de largo con los extremos redondos, no tiene cápsula y es asporógeno. Es móvil a 25°C, gracias a unos flagelos peritricos, pero no es móvil a 37°C. El desarrollo de los flagelos puede ser tan escaso que la movilidad puede llegar a ser imperceptible o nula. Es una bacteria Gram-positiva, catalasa positiva, oxidasa negativa y anaerobia facultativa. Produce citocromos y tiene un metabolismo fermentativo de la glucosa produciendo principalmente L (+) ácido láctico.

Es una bacteria ubicua en el medio ambiente y se puede encontrar en muchos animales. Requiere una gran atención porque crece en condiciones adversas y con unos requerimientos nutritivos limitados. Se encuentra en suelos, paredes, desagües, agua condensada y estancada y residuos de alimentos en el equipo

en entornos de procesamiento de carne. El patógeno es sensible a la cocción normal, pero puede contaminar los productos después del calentamiento, cuando se exponen al medio ambiente durante el corte, rebanado y re-embalado. El crecimiento ocurre en el rango de -0.4°C a 45°C , con un crecimiento óptimo en $30\text{--}37^{\circ}\text{C}$. El pH óptimo para el crecimiento es 7.0 con un rango de 4.39–9.40. El patógeno sobrevive a niveles de cloruro de sodio de hasta el 25%, pero requiere una actividad de agua superior a 0,92 para su crecimiento (Sofos, 2014). Es un organismo psicrótrofo, por lo que el almacenamiento en frío no inhibe el crecimiento de *Listeria* (Lavilla Lerma et al., 2014). La posibilidad de contaminación por *Listeria* tras la elaboración y el hecho de que siga multiplicándose durante el almacenamiento en refrigeración lo hace extremadamente peligroso en alimentos, principalmente cárnicos, listos para el consumo que no requieran un calentamiento previo.

La listeriosis en humanos es una enfermedad poco frecuente que se acompaña de altas tasas de mortalidad a través de septicemia, meningitis, aborto espontáneo y muerte fetal afecta principalmente a adultos inmunodeprimidos, ancianos, mujeres embarazadas y recién nacidos (Kannan et al., 2020).

2.2. *Escherichia coli*

Aunque la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) son habitantes inofensivos del tracto gastrointestinal de los humanos y otros animales de sangre caliente, las cepas de ciertos serotipos causan enfermedades de tipo diarreico. Estas cepas, desde el tracto gastrointestinal, contaminan el exterior de los animales, el suelo y el agua y, en consecuencia, los productos cárnicos y los alimentos de origen vegetal.

De los diversos grupos de *E. coli* causantes de enfermedades, las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) de shigatoxina o los serotipos de *E. coli* verotoxigénica (STEC/VTEC) son de mayor preocupación en productos cárnicos

poco cocinados (Sofos, 2014). Una de las variantes más virulentas y que puede causar mayor preocupación en la seguridad alimentaria es *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) serotipo *O157:H7*, este patógeno, transmitido por los alimentos, causa el síndrome urémico hemolítico (SUH) que conduce a la destrucción de glóbulos rojos e insuficiencia renal. La virulencia de *E. coli O157:H7* se atribuye a las fimbrias, que facilitan la colonización de bacterias dentro del colon y las verotoxinas (VT) o toxinas Shiga (Stx) que se liberan en la sangre. Aunque, en la mayoría de los casos, la infección es autolimitada en niños pequeños, sin embargo en la población anciana puede ser de gravedad (Saeedi et al., 2017).

Las bacterias de la especie *E. coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos, Gram-negativos, quimio-heterótrofos, catalasa positivos, oxidasa negativos y anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar unas de otras teniendo como base sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Evans et al., 1979). Como la mayoría de las otras bacterias Gramnegativas no patógenas, los coliformes crecen bien en una variedad de medios de cultivo y en muchos alimentos. Se ha descrito que estas bacterias pueden crecer a temperaturas tan bajas como -2°C y tan altas como 50°C . En los alimentos, el crecimiento es excesivo o muy lento a 5°C , aunque varios investigadores han reportado que el crecimiento de coliformes ocurre a $3-6^{\circ}\text{C}$ (Jay et al., 2005), la temperatura óptima de crecimiento es de $35 - 40^{\circ}\text{C}$ y el pH óptimo oscila entre 6,0 y 7,0 (Sofos, 2014) aunque pueden llegar a crecer en un rango de pH de 4,4 a 9,0. *Escherichia coli* se puede cultivar en un medio mínimo que contenga solo una fuente de carbono orgánico, como glucosa y una fuente de nitrógenos como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y otros minerales. Los coliformes crecen bien en presencia de nutrientes y producen colonias visibles en 12-16 horas a 37°C , también pueden crecer en un gran número de alimentos bajo condiciones favorables (Jay et al., 2005).

2.3. Las bacterias del ácido láctico (BAL).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son ubicuas tanto en los alimentos fermentados como no fermentados y son componentes comunes de la microbiota comensal humana, obteniendo el estatus GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) o el estatus QPS (Presunción Cualificada de Seguridad) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) (Russo et al., 2017; Vinderola et al., 2019). Además, en los últimos años se ha centrado la atención en su posible papel como bacterias probióticas que pueden promover efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, varios informes han reportado infecciones humanas causadas por las BAL, estas infecciones están ocasionadas en la mayoría de los casos en pacientes que tenían alguna enfermedad subyacente o condición predisponente (Adams, 1999).

Las BAL incluyen un grupo diverso de cocos, cocobacilos o bacilos Gram-positivos que no forman esporas, con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas comunes. Son anaeróbicos facultativos con tolerancia variable al oxígeno en diferentes especies. El crecimiento de las BAL depende de la presencia de carbohidratos fermentables (azúcares) por lo que se clasifican como homofermentativas o heterofermentativas según los productos finales del metabolismo de estos. Mientras que las BAL homofermentativas convierten la glucosa principalmente en ácido láctico mediante la vía de la glucólisis, las BAL heterofermentativas utilizan la vía de la fosfoacetolasa para convertir la glucosa en ácido láctico, dióxido de carbono y etanol o ácido acético (Fraqueza, 2015). Su metabolismo biosintético es muy escaso, por lo que requieren medios de cultivos ricos, con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Lavilla Lerma et al., 2014a).

Este grupo heterogéneo de bacterias comprende unos 20 géneros dentro del phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Lactobacillales*. Las diferentes familias

incluyen *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. Desde un punto de vista práctico, los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* han sido considerados como las principales BAL.

Este grupo diverso de organismos con una diversa capacidad metabólica los hace fácilmente adaptables a una amplia gama de condiciones, lo que les permite prosperar en las fermentaciones de alimentos. Se encuentran ampliamente en la naturaleza, adaptados a diferentes nichos ambientales ricos en carbohidratos (suelo y agua), así como a animales terrestres y marinos (incluido, cómo hemos mencionado, el hombre). En los productos alimenticios, las BAL se encuentran en los productos lácteos (yogur y queso), en las verduras fermentadas (aceitunas, chucrut), en la carne y productos cárnicos fermentados y en el pan de masa madre. Además, las BAL juegan un papel reconocido en la conservación y seguridad de los alimentos fermentados, promoviendo así la estabilidad microbiana de los productos finales. La capacidad de conservación de las BAL se basa en la competencia por los nutrientes y la producción de metabolitos activos antimicrobianos como los ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico y ácido acético), peróxido de hidrógeno y compuestos peptídicos (bacteriocinas) (Fraqueza, 2015). No obstante, debemos destacar también el papel como patógenas oportunistas en hombre y animales, destacando a *Enterococcus* y *Streptococcus*, e incluso *Lactobacillus* (Lavilla Lerma et al., 2014a).

2.4. *Enterococcus*

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de las BAL y se trata de cocos Gram-positivos, no formadores de esporas, oxidasa-negativos, anaerobios facultativos que se presentan de forma individual, en pares o en cadenas (Foulquié-Moreno et al., 2006). Carecen de catalasa, pero poseen superóxidodismutasa y peroxidasa que eliminan el superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente, que se generan en condiciones de aerobiosis. Los enterococos catabolizan una gran variedad de fuentes energéticas, como son los carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina y cetoácidos y son capaces de sobrevivir en condiciones ambientales muy adversas (Lavilla Lerma et al., 2014a).

Desde un punto de vista taxonómico, el género *Enterococcus* ha sido revisado varias veces. Hasta la fecha, 28 especies, a saber, *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus* y *E. villorum*, se han agregado al género sobre la base de la evidencia filogenética reforzada por la secuenciación del ADN del ARNr 16S y / o estudios de hibridación del ADN del ADN.

Los enterococos crecen de manera óptima a una temperatura de 37°C, aunque la mayoría de las especies del género crecerán a temperaturas que oscilan entre los 10 y los 45°C (Tabla 3). También pueden crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a pH 9,6, y sobreviven al calentamiento a 60°C durante 30 min, no obstante hay diferencias en las características fisiológicas entre especies lo que evidenciamos en la siguiente tabla (Foulquié-Moreno et al., 2006).

Tabla 3. Propiedades fisiológicas características de especies de enterococos válidamente descritas.

Especies de <i>Enterococcus</i>	Crecimiento a:		Crecimiento en presencia de:				Hidrólisis de la esculina	Antígeno del grupo D
	10°C	45°C	pH 9.6	6.5% NaCl	40% bilis	0.04% azida de sodio		
<i>E. asini</i>	(+)	(+)	n.d.		+	n.d.	+	+
<i>E. avium</i>	V	+	+	V	V/+	n.d.	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	+	V/+	+	+	+	+
<i>E. cecorum</i>		+	(+)		(+)		+	
<i>E. columbae</i>		n.d.	n.d.		(+)		+	
<i>E. dispar</i>	+	-	n.d.	+/-	+		+	
<i>E. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. flavescens</i>	V/-	V/+	n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. haemoperoxidus</i>	+		n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>E. malodoratus</i>	+		+	+	+	n.d.	+	+
<i>E. moraviensis</i>	+		n.d.	+	+	+	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. porcinus</i>	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	+/-	V/+	n.d.	+	
<i>E. raffinosus</i>	(+)	+	+	+	V/+	n.d.	+	n.d.
<i>E. ratti</i>	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	(+)

<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	n.d.	(+)	+	n.d.	+	
<i>E. solitarius</i>	+	+	n.d.	+	+	n.d.	+	+
<i>E. sulfureus</i>	+		n.d.	+	+	n.d.	+	
<i>E. villorum</i>	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	n.d.

n.d., no determinado; (+), positivo débil; V, variable; +/-, informes diferentes en la literatura; *E. solitarius* está válidamente publicado, pero basado en datos moleculares, parece pertenecer al género *Tetragenococcus*.

Fuente. Tabla modificada de Franz et al. (2003).

Los enterococos se distribuyen ampliamente en el medio ambiente, principalmente en el tracto gastrointestinal humano y animal (Foulquié-Moreno et al., 2006), de ahí que su presencia sea indicadora de contaminación fecal. La presencia de gran número de enterococos en los alimentos, a excepción de cuando se encuentran en alimentos fermentados por cepas específicas, implica prácticas inadecuadas de higiene (International Commission on Microbiological Specifications for Foods “ICMSF”, 2000) (Lavilla et al., 2014a). Por otro lado, está bien establecido que los enterococos existen de forma natural en plantas e insectos y en suelos, pero, en general, su procedencia puede ser de materia fecal animal. Dichos enterococos pueden considerarse residentes temporales y se propagan entre la vegetación por los insectos y el viento, llegando al suelo por estos medios, por la lluvia y por la gravedad (Jay et al., 2005).

La resistencia de los enterococos a las temperaturas de pasteurización y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento (baja y alta temperatura, pH extremo y salinidad) implica que pueden encontrarse tanto en productos alimenticios elaborados a partir de materias primas (leche o carne) como en productos alimenticios tratados térmicamente. Esto significa que estas bacterias podrían soportar las condiciones habituales de producción de alimentos, además de que pueden contaminar los productos terminados durante el procesamiento de alimentos. Centrándonos en la carne, la presencia de enterococos en el tracto gastrointestinal de los animales puede provocar la

contaminación de la carne en el momento del sacrificio, en un estudio de enterococos de productos cárnicos crudos, *E. faecalis* fue el aislado predominante de cortes de carne de bóvidos y cerdo. Además de las carnes crudas, los enterococos también se asocian con las carnes procesadas, el calentamiento de las carnes procesadas durante la producción puede conferir una ventaja selectiva a los enterococos porque estas bacterias se encuentran entre las más termotolerantes de las bacterias no esporulantes. Después de sobrevivir a la etapa de procesamiento térmico, tanto *E. faecalis* como *E. faecium* también se han visto implicadas en el deterioro de productos cárnicos curados. La aportación de los enterococos a la industria alimentaria es evidente, por su contribución a las propiedades organolépticas de los productos alimenticios fermentados y por su capacidad para producir bacteriocinas (enterocinas) como características más importantes (Foulquié-Moreno et al., 2006). Es cierto que pueden estropear las carnes procesadas, pero por otro lado, son importantes para la maduración y el desarrollo del aroma de ciertos quesos y embutidos tradicionales, especialmente los producidos en la zona mediterránea, además, Los enterococos también se utilizan como probióticos humanos (Franz et al., 2003). No obstante, la selección de enterococos para que participen en los procesos alimentarios es una tarea difícil, debido a su riesgo potencial para la salud humana (Foulquié-Moreno et al., 2006).

Los enterococos son patógenos oportunistas y por lo general causan infecciones en pacientes que tienen una enfermedad subyacente grave o que están inmunodeprimidos. Un motivo específico de preocupación y un factor que contribuye a la patogenia de los enterococos es su resistencia a una amplia variedad de antibióticos. Los enterococos son intrínsecamente resistentes a varios antibióticos, que están mediados por genes ubicados en el cromosoma, los ejemplos de resistencia intrínseca a los antibióticos incluyen resistencia a cefalosporinas, β -lactámicos, sulfonamidas y niveles bajos de clindamicina y aminoglucósidos. Esto es distinto de la resistencia adquirida que está mediada

por genes que residen en plásmidos o transposones, algunos ejemplos de resistencia adquirida incluyen resistencia al cloranfenicol, eritromicina, altos niveles de clindamicina y aminoglucósidos, tetraciclina, altos niveles de β -lactámicos, fluoroquinolonas y glicopéptidos, tales como vancomicina. Precisamente, la resistencia a la vancomicina es de especial preocupación porque este antibiótico se considera como el último recurso para el tratamiento de múltiples infecciones por enterococos resistentes. La aparición de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) en los hospitales ha provocado infecciones que no se pueden tratar con la terapia antibiótica convencional (Franz et al., 2003). También, se ha visto una gran tolerancia a los biocidas comúnmente usados como desinfectantes en la industria alimentaria (Lavilla Lerma et al. 2014a), lo que complica su control en un entorno de procesamiento poco higiénico.

2.5. Staphylococcus aureus

Staphylococcus es una bacteria esférica, no esporulante e inmóvil que, cuando se observa al microscopio, se presenta en pares, cadenas cortas o racimos en forma de uva. Estas bacterias anaerobias facultativas son Gram y catalasa positivas. Los estafilococos son omnipresentes en el medio ambiente y se pueden encontrar en el aire, el polvo, las aguas residuales, el agua, las superficies ambientales, los seres humanos y los animales (Hennekinne et al., 2012).

El género *Staphylococcus* pertenece al orden *Bacillales* y a la familia *Staphylococcaceae* (Lavilla Lerma et al., 2014a). Hasta la fecha, se han descrito más de 50 especies y subespecies de estafilococos según su potencial para producir coagulasa. Por tanto, su clasificación distingue entre cepas productoras de coagulasa, denominadas estafilococos coagulasa positivos y cepas no

productoras de coagulasa, denominadas estafilococos coagulasa negativos. Entre los estafilococos coagulasa negativos, se sabe que algunas especies desempeñan un papel importante en la fermentación de productos cárnicos y lácteos y, por lo tanto, se consideran de calidad alimentaria. Entre las siete especies descritas pertenecientes al grupo de estafilococos coagulasa positivos, *S. aureus* es el principal agente causal descrito en las intoxicaciones alimentarias (Hennekinne et al., 2012), siendo patógenos oportunistas para el hombre y animales.

Staphylococcus aureus, tiene todas las características típicas del género: anaerobio facultativo, mesófilo, necesita aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa y el manitol con producción de ácido y tolera condiciones ambientales muy variables. Su temperatura y pH de crecimientos óptimos son 30-37°C y valores de pH cercanos a la neutralidad. Es tolerante con respecto a la sal, resistiendo concentraciones de hasta un 20% de NaCl, lo que le permite desarrollarse en productos con baja aw (Lavilla Lerma et al., 2014a). *Staphylococcus aureus* puede estar presente en la carne cruda, pero su presencia es superada por otras bacterias. Puede convertirse en un problema en los productos cárnicos procesados, donde generalmente es introducido por humanos y la competencia de los organismos de descomposición es limitada. Luego, si se abusa de la temperatura del producto, el patógeno puede producir enterotoxinas resistentes al calor (Sofos, 2014).

Su virulencia depende de una gran variedad de factores, principalmente proteínas extracelulares, como enzimas y exotoxinas, que contribuyen a causar enfermedades. Las cepas de *S. aureus* pueden albergar diferentes genes de virulencia que codifican enterotoxinas estafilocócicas (SE), leucocidinas, exfoliatinas, hemolisinas, toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1), alelos reguladores de genes accesorios (*agr*) y resistencia a los antibióticos. Entre los factores que contribuyen a la virulencia de este patógeno, la resistencia

a los antibióticos juega un papel importante. Las cepas de *S. aureus* se pueden caracterizar por resistencia a un solo fármaco y a múltiples antibióticos y representan una amenaza importante para la salud pública, en particular para *S. aureus* resistente a la meticilina. Se han encontrado cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina en ganado, vinculado a una diseminación de humanos a animales. La prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina asociado al ganado en animales de granja está aumentando y los productos alimenticios resultantes pueden contaminarse. Este puede ser un nicho ecológico importante, favoreciendo la evolución de estas cepas y la prevalencia aparentemente creciente puede conducir a brotes en humanos. En los alimentos destinados al consumo humano se encuentran linajes distintos a *S. aureus* resistentes a la meticilina (Rodríguez-Lázaro et al., 2017).

La ingesta de alimentos contaminados con *S. aureus* puede causar intoxicaciones severas que incluyen vómitos, gastroenteritis, náuseas, diarrea y dolor abdominal principalmente asociados a las toxinas producidas por esta bacteria (Lavilla Lerma et al., 2014a).

2.6. *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* (familia *Pseudomonadaceae*, clase *Gammaproteobacteria*) comprende unas 272 especies identificadas. La taxonomía del género *Pseudomonas* se ha revisado profundamente en las últimas dos décadas y se han producido muchos cambios y reclasificaciones, finalmente el género *Pseudomonas*, en sentido estricto, fue reorganizado en 7 diferentes subgrupos (*P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*) entre los cuales el subgrupo de *P. aeruginosa* es el más distintivo.

Se considera el grupo más heterogéneo de bacterias Gram-negativas, que incluye bacterias aeróbicas saprofitas (aunque algunas especies pueden crecer anaeróbicamente), en forma de bastones y móviles, son catalasas positivas y no formadoras de esporas. Dependiendo de la especie, las pseudomonas pueden abarcar desde especies psicrótróficas (que crecen por debajo de 15°C) a especies más termófilas que el resto como *P. aeruginosa* (que puede crecer hasta a 42°C). Debido a sus simples requerimientos nutricionales y su alta versatilidad metabólica, estas bacterias son omnipresentes, pudiendo ser aisladas de una variedad de fuentes (suelo, agua dulce, humanos, plantas y superficies de animales, instrumentos médicos, alimentos).

Algunas especies de *Pseudomonas* pueden actuar como patógenos oportunistas del hombre y de los animales y/o actuar como organismos específicos del deterioro. En particular, las pseudomonas están involucradas en la liberación de sabores desagradables debido a la producción de compuestos volátiles y metabolitos de aminoácidos, además pueden producir compuestos proteolíticos y lipolíticos termotolerantes que reducen en gran medida la calidad y la vida útil de los alimentos proteicos (leche, productos lácteos frescos y productos cárnicos). A diferencia de los otros microorganismos termotolerantes asociados con la descomposición que no son capaces de adaptarse y crecer a baja temperatura y bajo estrés oxidativo, las pseudomonas psicrótróficas pueden colonizar rápidamente alimentos refrigerados causando deterioro y formación de biopelículas. Este último mecanismo mejora su adaptabilidad y propagación, haciendo que su erradicación sea muy complicada y mejorando su resistencia a los fármacos y desinfectantes.

Las pérdidas económicas debidas al deterioro de alimentos por *Pseudomonas* ssp. Son aproximadamente un tercio de las partes comestibles de los alimentos producidos globalmente. Un 70% de las bacterias psicrótróficas deteriorantes aisladas de alimentos refrigerados pertenece a las especies del género

Pseudomonas, por lo que una gran parte de las pérdidas de alimentos en la etapa de consumo se pueden atribuir a estas bacterias. Su elevada diseminación en entornos de procesamiento, desde los que se pueden transferir fácilmente a los alimentos en cualquier etapa de la producción, se correlacionó con la capacidad de tolerar una amplia variedad de condiciones, incluida la exposición a desinfectantes convencionales.

En relación a su comportamiento como patógeno cabe indicar que *P. aeruginosa* es la especie que con más frecuencia se asocia a enfermedades en pacientes hospitalizados, donde actúa como un patógeno oportunista (Quintieri et al., 2019), ya que forman parte de la microbiota bacteriana normal de la faringe, membranas mucosas y piel de los humanos (Lavilla Lerma et al., 2014) y puede causar infecciones en casi cualquier órgano o tejido, especialmente en pacientes con un sistema inmunológico debilitado. Como se ha indicado con anterioridad, la mayoría de las bacterias de este grupo pueden colonizar de forma natural tanto los alimentos frescos, como su entorno de procesamiento, no obstante en los alimentos frescos mínimamente procesados, estas bacterias no son consideradas como indicadores de higiene y seguridad, incluso se toleran altas cargas en productos lácteos y carnes frescas. De hecho, las *pseudomonas* asociadas a los alimentos se consideran bacterias comensales pero pueden transferir genes de resistencia a los antibióticos a bacterias patógenas humanas durante el procesamiento de alimentos o después de la ingestión, aumentando los posibles riesgos para la salud humana (Quintieri et al., 2019).

3. Los antibióticos

3.1. Generalidades de los antibióticos

Los antibióticos son agentes quimioterapéuticos, que han sido una herramienta muy poderosa en el tratamiento clínico de enfermedades

bacterianas desde la década de 1940. El término “*antibiótico*” fue acuñado por primera vez por el microbiólogo estadounidense Selman Waksman y sus colaboradores para describir sustancias químicas producidas por microorganismos, que tienen efectos antagónicos sobre el crecimiento de otros microorganismos. Excluyó los antimicrobianos sintéticos (medicamentos de azufre) y los productos biológicos de origen no microbiano que tienen efectos antagónicos sobre las bacterias. Aunque los antibióticos se introdujeron en la práctica clínica, solo a mediados del siglo pasado, el uso de microorganismos para el tratamiento de infecciones microbianas en el antiguo Egipto, Grecia, China y algunos otros lugares del mundo está bien documentado. La era moderna de los antibióticos comenzó con el descubrimiento fortuito de la penicilina a partir del filtrado de cultivo de un hongo, *Penicillium notatum* por Alexander Fleming en 1928 (Sengupta et al., 2013)

Desde entonces, estas "balas mágicas" han transformado la medicina y han salvado innumerables vidas. En la década de 1940, se realizó la primera prescripción de antibióticos. Durante la Segunda Guerra Mundial, la penicilina se consideró como el fármaco de elección y se utilizó para controlar las infecciones bacterianas entre las fuerzas armadas. Desafortunadamente, poco después, la resistencia a la penicilina resultó ser una preocupación clínica significativa. Entonces, la mayoría de los avances logrados en la década de 1940 se vieron amenazados durante la década posterior. Sin embargo, para mantener el uso de estrategias de tratamiento con antibióticos, los científicos pronto descubrieron y desarrollaron nuevos antibióticos, los β -lactámicos. Sin embargo, el primer caso de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) se informó en el Reino Unido y en los EE. UU. en 1962 y 1968, respectivamente, en la misma década en que se aplicaron nuevos antibióticos (Aslam et al., 2018)

En el escenario actual, los antibióticos disponibles en el mercado se producen por fermentación microbiana o se derivan por vía semisintética utilizando la

estructura principal de antibióticos existentes. Se clasifican en diferentes grupos químicamente definidos. Los antibióticos se dirigen a la fisiología y bioquímica bacteriana, provocando la muerte de las células microbianas o el cese del crecimiento. Un número significativo de estos antibióticos afecta las paredes o membranas celulares (por ejemplo, β -lactámicos y glicopéptidos), mientras que varios gruposejercen su actividad antibacteriana al dirigirse a la maquinaria sintética de proteínas a través de la interacción con subunidades ribosómicas y estos incluyen antibióticos como macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, linezolid y aminoglucósidos. Otros grupos incluyen moléculas que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo, fluoroquinolonas) mientras que otros ejercen sus efectos interfiriendo con las vías metabólicas (por ejemplo, sulfonamidas y análogos de ácido fólico) o mediante la alteración de la estructura de la membrana bacteriana (por ejemplo, polimixinas, daptomicina y otras).

Una oleada de descubrimiento de varios antibióticos antibacterianos y antifúngicos, acompañados de una nueva generación de fármacos semisintéticos, llevó inicialmente a la euforia de que cualquier enfermedad infecciosa podría controlarse con éxito utilizando antibióticos. Sin embargo, la aparición y propagación de cepas bacterianas, resistentes a casi todos los antibióticos terapéuticamente útiles durante las últimas décadas, reveló la limitación de los fármacos maravillosos. Aunque se destaca el uso imprudente y excesivo de antibióticos como un factor causante importante, en este momento es evidente que la resistencia a los antibióticos no requiere la exposición de los organismos a los antibióticos. También se encuentra que los genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos y la resistencia a los mismos evolucionaron miles de años antes de que los antibióticos se introdujeran en la práctica clínica (Sengupta et al., 2013).

3.2. Clasificación

Los antibióticos constituyen un grupo de sustancias que se utilizan en medicina para controlar y disminuir el número de microorganismos viables en una infección y que el sistema inmune del enfermo pueda defenderse y acabar eliminando la totalidad de los mismos.

Debido a la enorme heterogeneidad del grupo podemos clasificar a los antibióticos de múltiples formas:

De acuerdo a la interacción germen-antibiótico, estos fármacos pueden dividirse en:

- a) Bactericidas: su acción es letal, llevando a la muerte bacteriana con o sin lisis.
- b) Bacteriostáticos: a las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células. De hecho, cuando se retira el antibiótico, el microorganismo se puede multiplicar de nuevo.

Según el espectro de acción los podemos clasificar en:

- a) Amplio: aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes.
- b) Reducido: antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies.

Por último, veremos la clasificación según el mecanismo de acción (Tabla 4), que es la más utilizada y la que desarrollaremos a continuación, esta clasificación se basa en diferenciar a los antibióticos según el mecanismo por el cual es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis

proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de la membrana citoplasmática, inhibidores de vías metabólicas (Seija & Vignoli, 2006).

Tabla 4. Clasificación de antibióticos según el mecanismo de acción.

Mecanismo de acción	Grupo de antibióticos	Subgrupo de antibióticos	Observaciones / ejemplos
Actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana	Beta-lactámicos	Penicilinas	<ul style="list-style-type: none"> Bencilpenicilinas: bencilpenicilina Isoxazolilpenicilinas: cloxacilina Aminopenicilinas: amoxicilina; ampicilina. Ureidopenicilinas: piperacilina
		Cefalosporinas	<ul style="list-style-type: none"> 1.^a generación: cefadroxilo. 2.^a generación: cefaclor, cefuroxima. 3.^a generación: cefixima, cefpodoxima 4.^a generación: cefepima. 5.^a generación: ceftarolinafosami
		Monobactámicos	Aztreonam
		Carbapenemes	Imipenem
	*Inhibidores de Beta-Lactamasas		No actúan sobre la pared bacteriana directamente, inhiben la acción de Beta-lactamasa que es la principal causante de resistencias bacterianas a los betalactámicos. Ejemplo: Ac. Clavulánico
	Glicopéptidos		Vancomicina

Actúan sobre la membrana celular bacteriana	Polimixina		Polimixina B Polimixina E El resto de tipos de presentan alta toxicidad		
Actúan alterando el ADN bacteriano	Quinolonas		<ul style="list-style-type: none"> • 1.^a Generación: ácido nalidíxico • 2.^a Generación: ciprofloxacino. • 3.^a Generación: levofloxacino. • 4.^a Generación: moxifloxacino. 		
	Nitroimidazoles		Metronidazol		
Actúan sobre la transcripción del ARN	Rifamicinas		Rifampicina		
Actúan sobre la síntesis proteica	Actúan sobre la unidad 30S	Aminoglucósidos	Estreptomina, Gentamicina		
		Tetraciclinas	<ul style="list-style-type: none"> • 1^a Generación: Tetraciclina • 2^a Generación: Doxiciclina • 3^a Generación: Oxitetraciclina 		
	Actúan sobre la unidad 50S	Anfenicoles	Cloranfenicol		
		Lincosamidas	Clindamicina		
		Macrólidos	14 átomos	Eritromicina	
			15 átomos	Azitromicina	
			16 átomos	Espiramicina	
Oxazolidinona	Linezolid				
Inhibidores de la síntesis del ácido fólico	Sulfonamidas		Sulfametoxazol		
Grupo miscelánea	Existe multitud de antibióticos que las clasificaciones consultadas asignan a un grupo aparte por no ajustarse a los grupos descritos en la tabla, algunos ejemplos son la fosfomicina que actúa sobre una enzima bacteriana clave para la síntesis de la pared o la bacitracina.				

Fuente. Obando Pacheco et al. (2020); Seija & Vignoli (2006).

3.3. La utilización de antibióticos en los animales y sus consecuencias

En la industria alimentaria se usan una serie de compuestos antimicrobianos con el fin de, por un lado mejorar los datos de productividad y eficiencia del sistema agroalimentario y, por otro, de garantizar una mayor inocuidad de los alimentos generados. Recordemos que los principales grupos de antimicrobianos utilizados durante la producción de alimentos son:

- **Antibióticos:** Dentro del ámbito de la industria agroalimentaria su presencia se debe principalmente al uso en animales productores de alimentos con la intención de prevenir enfermedades infecciosas y, en aquellos países en los que está permitido, como promotores del crecimiento (en la Unión Europea ha sido prohibido su uso a partir de 2006).
- **Fungicidas:** Compuestos químicos utilizados para inhibir el crecimiento o prevenir la aparición de hongos.
- **Biocidas:** Término genérico que abarca a cualquier principio activo o conjunto de principios activos utilizados para destruir cualquier organismo nocivo por medios físicos, químicos o biológicos. Son sustancias de amplio espectro. Dentro de los biocidas podemos encontrar varias formas de utilización, se pueden añadir a los piensos o alimentos como aditivos con la intención de aumentar su vida útil controlando la posible aparición de organismos patógenos, los podemos utilizar como descontaminantes en superficies de alimentos frescos y también, en el que quizás sea su uso más conocido, como desinfectantes en superficies y equipos de la industria o en tratamientos de aguas (Buzón Durán, 2017).

Centrándonos en los antibióticos podemos decir que el aumento de su uso viene marcado por la industrialización, que llevó a que en el siglo XX se desarrollara la explotación intensiva con el objetivo de una mayor productividad. Esta explotación intensiva derivó en una mayor prevalencia de enfermedades zoonóticas y además, en la necesidad de un mayor rendimiento por lo que se comenzaron a usar antibióticos como promotores del crecimiento mediante su formulación en piensos (Silbergeld et al., 2008)

El uso de antimicrobianos en general y de antibióticos en particular como promotores del crecimiento se inició hace unos 50 años (Figura 2). Las primeras experiencias se realizaron a finales de los años 40 en pollos y demostraron los efectos beneficiosos de los antibióticos a dosis bajas. Su empleo con esta función fue extendiéndose y ya en los años 60 estaba ampliamente generalizado, usándose los mismos principios activos que, a dosis más altas se usan con fines terapéuticos, como las penicilinas o estreptomycinas (Cepero Briz, 2006). Se estima que tanto en Europa como en Norteamérica aproximadamente el 50% de los antibióticos consumidos se utilizaban como promotores del crecimiento (WHO, 2002). Sin embargo, enseguida surgieron las primeras críticas desde el mundo científico debido a que podían poner en riesgo la salud humana por la selección de bacterias resistentes a los antibióticos utilizados y la transmisión de estas bacterias a las personas a través de los alimentos (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

Cabe mencionar que, el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento está prohibido en Europa y que el mecanismo por el que un antibiótico favorece el crecimiento (aumenta hasta un 15% el peso del animal) (CDDEP, 2015) no está claro. Se piensa que o pueden modificar la microbiota intestinal disminuyendo la cantidad de microorganismos causantes de enfermedades subclínicas, o dan lugar a un adelgazamiento de la pared de los

eritrocitos (Lekshmi et al., 2017) o hacen que aumente la producción de vitaminas.

Además del uso como promotores del crecimiento los antibióticos tienen dos usos fundamentales en la producción animal:

- Uso para el tratamiento de infecciones, con el objetivo de reducir la transmisión de la infección a otros miembros del rebaño o grupo (CDDEP, 2015).
- Uso como profiláctico, previniendo infecciones mediante el tratamiento de todos los animales que forman parte del grupo o rebaño (CDDEP, 2015). Este tratamiento se realiza normalmente mediante piensos medicamentosos, que contienen dosis relativamente elevadas de antibióticos (Lekshmi et al., 2017).

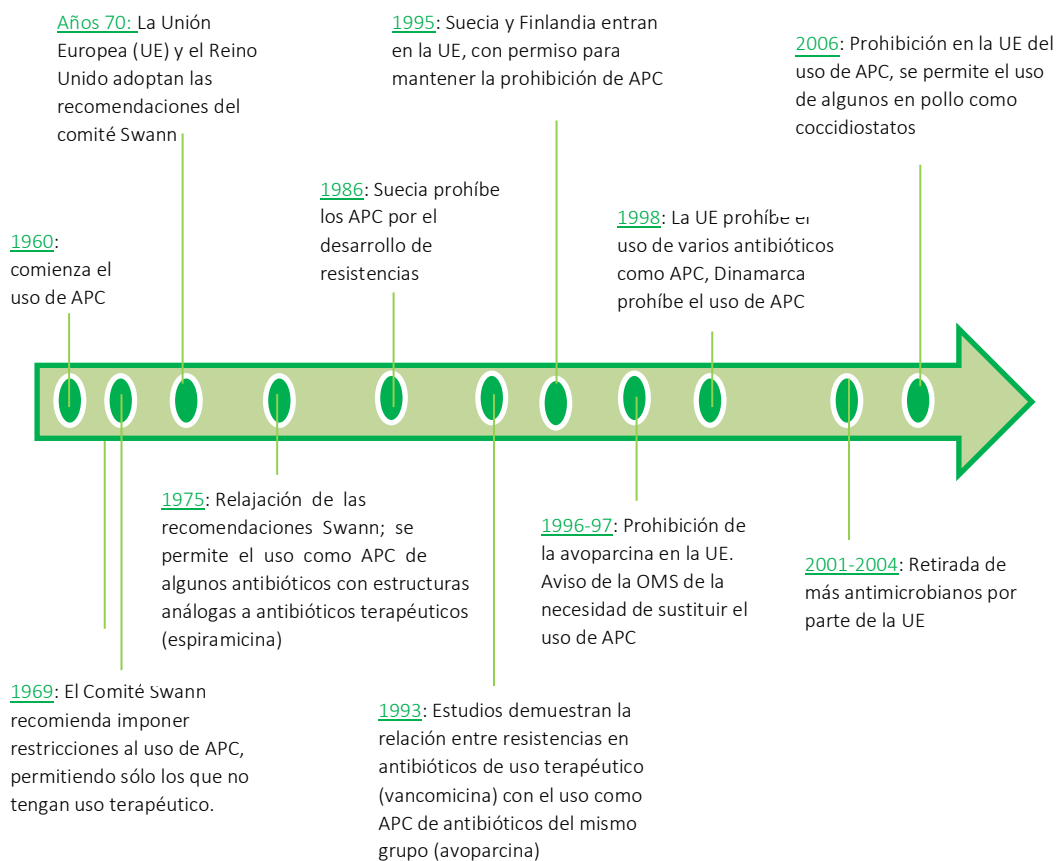


Figura 2. Línea temporal de la evolución del uso de antibióticos como promotores del crecimiento (APC). Fuente. (Cepero Briz, 2006; Edqvist & Pedersen, 2001).

Pese a que múltiples evidencias científicas relacionan el consumo de antimicrobianos en animales con el aumento de bacterias resistentes a los antibióticos, en 2010 63.200 toneladas de antibióticos fueron consumidas por animales de producción (Van Boeckel et al., 2015). Además, las predicciones de la evolución del consumo de antibióticos no son muy halagüeñas cifrando para 2030 en hasta 105.600 toneladas el consumo de antibióticos en ganadería, justificando este aumento por las necesidades de aumentar la producción animal debido al aumento de la población (WHO, 2014).

En Estados Unidos el consumo de antibióticos en animales se cifra en torno al 70% del consumo total (Van Boeckel et al., 2015). Según el último informe elaborado por la European Medicines Agency (EMA) dentro del proyecto de European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC), que abarca el periodo comprendido entre 2010 y 2017, en el último año del estudio, los países que más ventas de antimicrobianos para uso en animales fueron Chipre, Italia, España y Polonia y el grupo de antibióticos más usado fue el de las tetraciclinas.

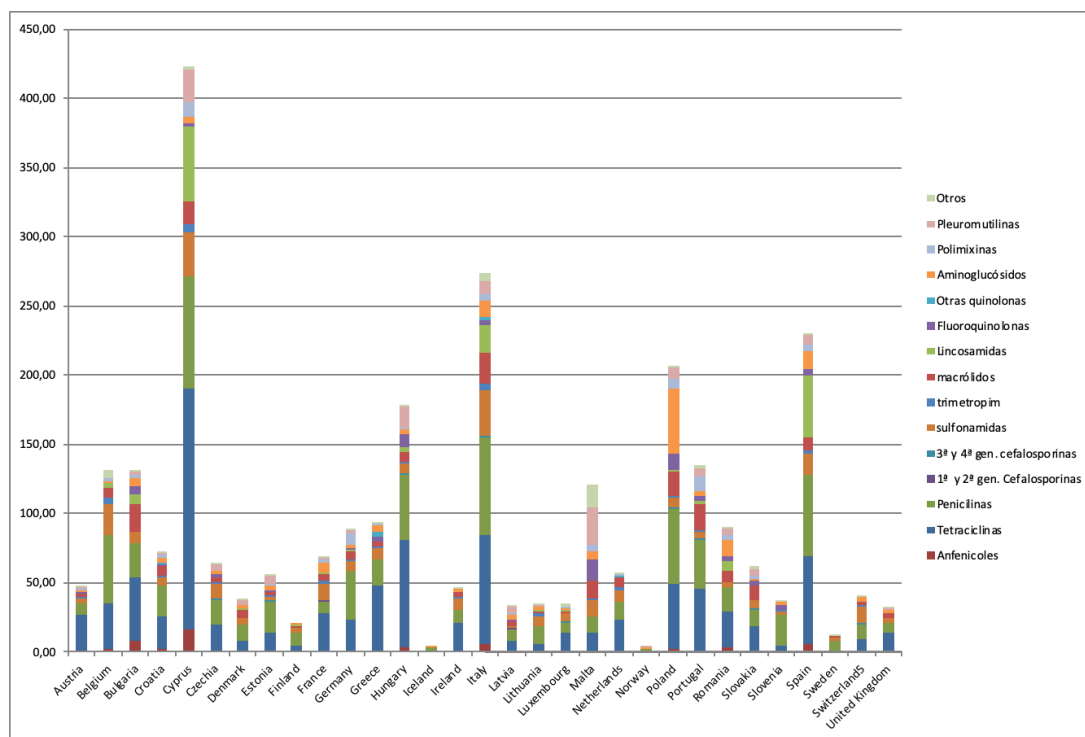


Figura 3. Ventas de varios antimicrobianos de uso veterinario en 31 países europeos en el año 2017 para producción animal en mg por PCU (Population Correction Unit, PCU), traducido como unidad de corrección en base a la población (mg/PCU). Fuente. (datos obtenidos del informe ESVAC, 2019).

En relación a la evolución del consumo de antimicrobianos para uso en animales en los países europeos, el mismo estudio indica que en líneas generales se ha producido un descenso de más del 5%, no obstante todavía hay tres países que han aumentado dicho consumo más del 5%, estos países son Grecia, Chipre y Bulgaria.

En relación a España, la evolución del consumo de las ventas de antibióticos para uso en animales ha descendido ligeramente en el periodo 2010-2017, aunque sufrió un aumento en los años intermedios con un pico de consumo en 2014, como se puede ver en el siguiente gráfico (Figura 4).

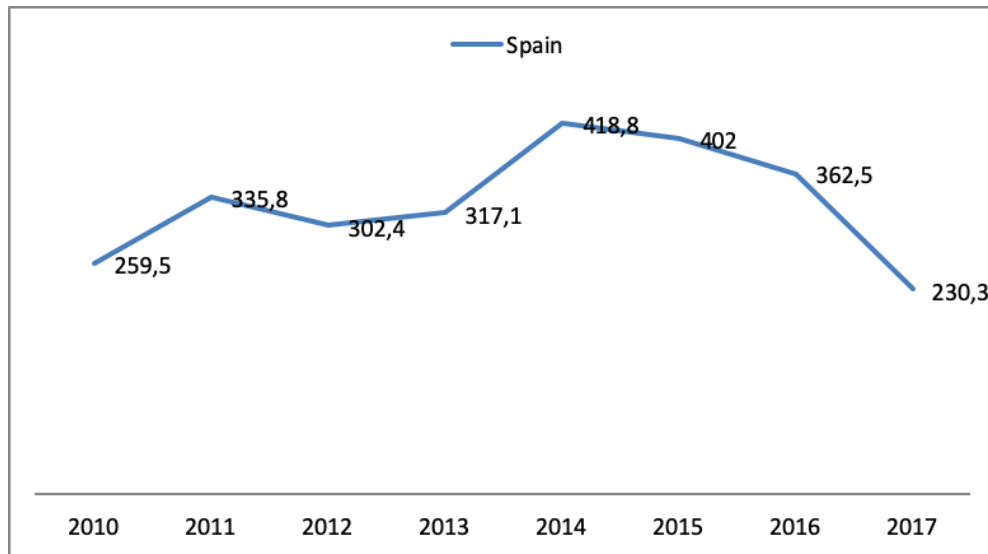


Figura 4. Ventas anuales de agentes antimicrobianos para uso en veterinaria (en mg/PCU) en España de 2010 a 2017. Fuente. (datos obtenidos del informe ESVAC, 2019).

Esto expone que el uso de antibióticos en nuestro país no ha disminuido lo suficiente, apenas un 11%, pese a la problemática higiénico-sanitaria que presenta debido principalmente a dos tipos de efectos, por un lado los efectos que se provocan por su empleo a dosis terapéuticas y la posible persistencia de los principios activos en los alimentos en el caso de no respetar los tiempos de espera establecidos y por otro diversos efectos indirectos cómo pueden ser la influencia negativa en el análisis microbiológico de los alimentos, la capacidad de inducir resistencias y las posibles interferencias en procesos microbianos necesarios para el elaboración de algunos alimentos (Hernández-Rodríguez y Sastre-Gallego, 1999).

Centrándonos en la problemática de la resistencia a los antibióticos, la Organización Mundial de la Salud (WHO) ya estableció en un informe en 2014 la resistencia a los antibióticos cómo una amenaza creciente para la salud pública. Si bien es cierto que el origen genético de la resistencia a los antibióticos es un tema de cierta controversia, en líneas generales la resistencia a los

antimicrobianos en las bacterias presentes en la cadena alimentaría se relaciona con el contacto de dichas bacterias con los diferentes agentes antimicrobianos (Levy & Marshall, 2004). No obstante, existen estudios que demuestran la presencia de los genes de resistencia antes del uso de estos principios activos (Bhullar et al., 2012; D'Costa et al., 2011), en cualquier caso el uso incorrecto de antibióticos con errores en las pautas de administración y el abuso de los mismos es el principal problema en relación al aumento de las resistencias a los antibióticos (Capita González, 2013).

El uso de fármacos en la producción agrícola en general y en la ganadería principalmente es uno de los principales impulsores de la resistencia a los antimicrobianos en todo el mundo por las siguientes razones:

1. El mayor uso de antimicrobianos en todo el mundo se produce en la producción de animales para el consumo humano de carne, leche y huevos.
2. Los antimicrobianos se utilizan como aditivos en la alimentación animal.
3. En la agricultura se utilizan fármacos de casi todas las clases de agentes clínicamente valiosos.
4. El mal uso o sobreuso da como resultado la exposición humana a patógenos resistentes a los antimicrobianos a través de los alimentos y mediante una liberación generalizada al medio ambiente de los mismos (Silbergeld et al., 2008).

4. La resistencia bacteriana a los antibióticos en la cadena de producción de carne

Cómo se indicaba en el punto anterior la resistencia de los microorganismos a los antibióticos es un problema que surge prácticamente desde el inicio del uso de estos principios activos en medicina, el propio Alexander Flemming ya advirtió

en una entrevista al New York Times, que el mal uso de la penicilina podría derivar en la aparición de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. Con el transcurso del tiempo, se demostró que A. Flemming había acertado ya que tan sólo un año después de la generalización del uso de la penicilina, las cepas de *S. aureus* resistentes a este antibiótico aumentaron considerablemente y unos años más tarde la mitad de las cepas de *S. aureus* de origen clínico dejaron de ser susceptibles a la penicilina (Levy, 2002) .

Esta problemática se está agravando con los años, ya hemos visto que además de los antibióticos existen otros tipos de antimicrobianos como biocidas, entre los cuales los desinfectantes de superficies, que se usan fundamentalmente en la cadena de producción de la industria alimentaria y cuyo uso cada vez es mayor. Pues bien, diversos estudios apuntan a que una mayor exposición a este tipo de biocidas conlleva un aumento de las resistencias a los antibióticos. Los mecanismos de acción de los antibióticos y el resto de biocidas tienen grandes similitudes (efectos sobre la integridad de la membrana, sobre el metabolismo bacteriano y sobre la entrada al interior celular mediante difusión pasiva), por lo que la permeabilidad, la presencia de bombas de eflujo o las alteraciones en la diana de los microorganismos son mecanismos compartidos por ambos tipos de compuestos, lo que puede provocar una resistencia cruzada (SCENIHR, 2009). Si añadimos que los biocidas son usados con una mayor frecuencia, aumentando la exposición de estos compuestos y por lo tanto la tolerancia de los microorganismos a los mismos, es posible que aparezcan resistencias a los antibióticos relacionadas con su uso, hecho ya observado en estudios *in vitro* (SCENIHR, 2009).

La forma en la que se relaciona la tolerancia a estos tipos de biocidas y la resistencia a los antibióticos se determina por:

- Resistencias cruzadas.

- Cambios en la respuesta bacteriana tras la exposición a los biocidas.
- Co-resistencias.
- Selección indirecta.
- Aumento de los mecanismos de reparación del ADN (SCENIHR, 2009).

Por lo que la posibilidad de que los microorganismos adquieran resistencias a los antibióticos a través de los biocidas es otra cuestión a tener en cuenta a la hora de valorar la aparición de nuevas resistencias, además de los mecanismos de resistencia que los microorganismos desarrollan por sí mismos y que veremos a continuación.

4.1. Mecanismos de Resistencia bacteriana

Las bacterias se adaptan con facilidad a las diferentes condiciones ambientales, además su patogenicidad se debe a la posesión de material genético que cuando se transfiere a otro organismo, confiere diferentes propiedades (colonización de tejidos, producción de sustancias tóxicas) y puede causar enfermedades (Betancor et al., 2008). Para conseguir esta patogenicidad y la adaptación necesaria en los diferentes hábitats donde se desarrollan, las bacterias han adquirido una serie de mecanismos de resistencia a los antibióticos:

- **Bombas de expulsión o de eflujo**

Las bombas de expulsión o eflujo son proteínas que se integran directamente en la membrana citoplasmática (bacterias Gram-positivas) o se constituyen por complejos proteicos ternarios con una bomba transmembranal, una proteína periplásmica de unión y una porina de la membrana externa (bacterias Gram-negativas) (Cattoir, 2004) que son capaces de eliminar de forma activa diferentes sustancias que penetran en las células, entre las que se incluyen los antibióticos, y que reducen así la concentración intracelular (Paulsen et al., 1997). Estas bombas además pueden ser exclusivas para un compuesto o actuar con varios

compuestos (Potenski et al., 2003). El primer caso que se documenta es la contribución de las bombas de expulsión a la resistencia microbiana a los antibióticos descrito por Poole et al. (1992).

- **Cambios en la permeabilidad bacteriana**

Las bacterias Gram-positivas tienen la característica principal de tener una pared celular que envuelve a la membrana plasmática, por lo contrario los microorganismos Gram-negativos tienen una pared celular, compuesta por peptidoglicano, dispuesta entre dos membranas, así la eficacia de determinados antibióticos frente a las diferentes bacterias se ve afectada por estas diferencias estructurales, ya que el acceso de los mismos a su diana no ocurre de la misma manera en los dos grupos de bacterias. Por lo tanto, cada grupo de bacterias será susceptible a unos determinados antibióticos. Las membranas que rodean la pared celular de las bacterias Gram-negativas son, una barrera de protección frente a agentes tóxicos presentes en el medio y un grupo complejo de mecanismos que permiten el paso de moléculas imprescindibles. Muchos antibióticos centran su actividad sobre estos mecanismos de transporte de membrana que modulan la concentración intracelular de la molécula antibacteriana (Livermore, 2003). Las resistencias aparecen cuando se producen mutaciones que afectan a la permeabilidad celular de las bacterias frente a determinados compuestos, por ejemplo *Serratia marcescens* presenta resistencia a carbapenem al reducir la permeabilidad de la pared celular y por lo tanto reduce la penetración de este antibiótico (Khameneh et al., 2016).

- **Degradación / modificación / inactivación enzimática**

Las bacterias pueden ser capaces de generar enzimas que degradan o modifican el antibiótico lo que provoca que este no sea efectivo. Un ejemplo de este mecanismo de resistencia ocurre en las bacterias resistentes a los β -lactámicos, estas bacterias producen una enzima, la β -lactamasa que hidroliza

el anillo β -lactámico provocando la inactivación del antibiótico, como ocurre en las enterobacterias (Khameneh et al., 2016). Además, cabe mencionar que algunos estudios apuntaron que se produce este tipo de resistencia frente a biocidas (Cloete, 2003; Valkova et al., 2001).

- **Modificación / superproducción / desvío / alteración / protección de la diana (target)**

Otras resistencias pueden aparecer por mutaciones en los receptores intracelulares de las bacterias lo que ocasiona la pérdida de la diana del antibiótico y por lo tanto la efectividad del mismo cómo, por ejemplo, la modificación de las proteínas dónde se anclan las penicilinas (Alanis, 2005).

- **Modificación del antibiótico**

La resistencia se produce por acción directa sobre el antibiótico. Esto puede ocurrir de dos formas, por un lado enzimas bacterianas pueden adicionar grupos químicos a sitios vulnerables de la molécula del antibiótico y prevenir la unión del antibiótico a su diana, como ocurre con las enzimas que modifican los aminoglucósidos y por otro pueden provocar la hidrólisis del mismo mediante la acción de enzimas (Blair et al., 2015).

- **Formación de biopelículas o biofilms**

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms. Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente

mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Lasa et al., 2005).

La formación de estos biofilms es un mecanismo indirecto de resistencia bacteriana frente a antibióticos ya que las células presentes en estas formaciones estructurales presentan una resistencia incrementada (Shi & Zhu, 2009). Los mecanismos de resistencia que generan estos biofilms pueden ser varios (Capita & Alonso-Calleja, 2013):

- Disminución de la difusión de las moléculas activas a través del biofilm debido a la matriz polimérica extracelular.
- Elevada concentración de bacterias en el biofilm.
- Modificación del estado fisiológico: disminución del metabolismo y del ritmo de crecimiento. Las poblaciones que crecen más lentamente son más resistentes.
- Alteración de la permeabilidad de la membrana por el descenso de la síntesis de porinas.
- Inducción de operones de multiresistencia y de la síntesis de bombas de expulsión.
- Superproducción de enzimas capaces de degradar los compuestos antimicrobianos.

Por todo esto los biofilms microbianos constituidos por cepas patógenas son considerados como un desafío global debido a la resistencia inherente a antibióticos conferida por el hábitat.

4.2. Diseminación de la Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es aquella que es inherente a una especie bacteriana y por lo tanto está presente en todas las cepas. Las bacterias que presentan este tipo de resistencia tienen genes que codifican la resistencia a determinados antibióticos mediante diferentes mecanismos como poseer dianas de baja afinidad, por producir enzimas de inactivación de antibióticos o por disminuir la accesibilidad del antimicrobiano a la célula bacteriana (Kumar & Schweizer, 2005). La propagación de la resistencia intrínseca es mínima entre diferentes especies bacterianas.

La resistencia adquirida ocurre cuando una bacteria originalmente sensible a un determinado compuesto antimicrobiano se convierte en resistente al mismo. Esto puede ocurrir por diferentes mecanismos como puede ser la presencia de enzimas que inactivan al antibiótico, mutaciones en la diana, la reducción de la permeabilidad al antimicrobiano o de la unión del mismo a la célula, modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales de la diana, expulsión del principio antimicrobiano, reducción de la captación o sobreproducción de la diana (Capita González, 2013; Sosa et al., 2009). Al igual que la resistencia intrínseca, la resistencia adquirida tiene de forma general un bajo índice de propagación horizontal, si esta se produce por una mutación cromosómica, sin embargo puede tener mayor potencial de diseminación horizontal si los genes de resistencia están presentes en elementos genéticos móviles (plásmidos y transposones) (Devirgiliis et al., 2013; Van Reenen & Dicks, 2011).

En general los diferentes genes de resistencia a los antimicrobianos pueden transmitirse entre bacterias mediante diferentes mecanismos. La transferencia de ADN por transducción (mediada por bacteriófagos), por transformación (cuando el ADN se libera de una bacteria y es captada por otra) o por conjugación (mediante contacto directo célula a célula mediante pilis). Los dos primeros no

son importantes en la transferencia de resistencias a los antibióticos (Ammor & Mayo, 2007), pero el tercer mecanismo puede transferir horizontalmente múltiples genes y se ha demostrado que es un mecanismo de transferencia genética entre una amplia gama de microorganismos (Courvalin, 1994).

La diseminación de la resistencia a los antibióticos se atribuye al intercambio de material genético (ADN), siendo la transferencia horizontal de los genes de resistencia situados en plásmidos (moléculas de ADN extracromosómico) el principal mecanismo para la adquisición de estas resistencias en los microorganismos patógenos causantes de infecciones comunitarias (Alanis, 2005). La presencia de microorganismos resistentes a determinados antibióticos capaces de transferir horizontalmente los genes que codifican estas resistencias, es un riesgo indirecto para la seguridad alimentaria de los consumidores y la posibilidad de que un microorganismo no patógeno transfiera la resistencia a antibióticos a otro patógeno puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria (Lester et al., 2006).

Es importante destacar que los antibióticos pueden ser excretados sin sufrir grandes modificaciones, de esta forma los principios activos persisten en el ambiente, pudiendo ser utilizados por microorganismos expuestos a los mismos para seleccionar resistencias (Rosenblatt-Farrell, 2009). Por otro lado, los manipuladores de alimentos pueden, si no mantienen un elevado nivel de higiene personal, contaminar los alimentos que van a consumir, tanto con microorganismos como con los propios agentes antibacterianos, de esta forma es el alimento el reservorio y fuente de transmisión de resistencias. Los genes que codifican los mecanismos de resistencias a antibióticos de uso en veterinaria se han aislado también en cepas bacterianas de origen humano, tanto patógenas como comensales, evidenciando que entre seres humanos y animales no sólo se contagian cepas de bacterias resistentes a los antibióticos, sino que también

se puede producir la transferencia de genes de resistencias (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

Por último, es importante mencionar que hay dos hechos importantes a la hora de explicar la adquisición de un mecanismo de resistencia:

- El primero es la presión selectiva que ejerce el propio antibiótico y que se explica debido a que en una población bacteriana los organismos resistentes a un antibiótico tienen una ventaja competitiva frente a las bacterias que no son resistentes al mismo, ya que sobreviven más fácilmente a la presencia de dicho agente antibacteriano. Lo que a su vez otorga una ventaja extra, al eliminar otros microorganismos comensales, así las bacterias patógenas resistentes al antibiótico pueden propagarse fácilmente al no encontrar competidores en el nicho ambiental.
- El segundo factor a destacar es la diseminación clonal. En una comunidad hay determinados clones específicos que se transfieren con una mayor facilidad, sin que se conozca con exactitud las razones de esta mayor facilidad de transmisión. Las cepas portadoras de genes de resistencia a los antibióticos, cuando se encuentran bajo la presión selectiva de antibióticos pueden ser más propensas a presentar este tipo de clones (Furuya & Lowy, 2006; Kirbis & Krizman, 2015).

4.3. Medidas para reducir la resistencia a antibióticos

Aunque parezca una obviedad, la principal causa de la resistencia a los antibióticos es el uso de los mismos y en concreto el mal uso (por abuso o por uso inadecuado). Cuanto más se usen antibióticos más presión selectiva existirá en una determinada población y, como se ha explicado, más propagación de las bacterias resistentes (WHO, 2012).

Existen múltiples opciones para reducir este uso inadecuado, pero se debe jugar con un equilibrio, en ocasiones difícil de mantener, ya que por un lado se debe de reducir el uso de los antibióticos y por otro se debe garantizar el acceso a los mismos a las personas que los necesitan. En esta relación debemos tener en cuenta dos hechos, el primero es que para que un antibiótico funcione, tiene que ser efectivo frente a la cepa que se pretende tratar, por lo que se deben fomentar estudios de la susceptibilidad bacteriana a antibióticos y el segundo factor clave es que el uso de un antibiótico en una determinada persona puede derivar en la selección de bacterias resistentes que ocasionen infecciones complicadas al transmitirse a otro individuo de la población (WHO, 2012). Por lo tanto la reducción del uso de los antibióticos es imprescindible, aunque puede ser complicada, y debemos planteárnosla como un claro objetivo a medio plazo. Para ello se antoja esencial la disminución de su uso en ganadería.

Ya hemos mencionado en puntos anteriores cómo a partir de la década de los cincuenta el uso de los antibióticos como suplemento en la alimentación de los animales ayudaba a mejorar los índices de conversión de los mismos pudiéndose ahorrar hasta un 20% de los costes de alimentación (Allen et al., 2013). Por fortuna este uso está en total decadencia en Europa, y actualmente el principal uso de los antibióticos en animales es para el tratamiento de enfermedades o prevención de las mismas. No obstante, la medida de prohibirlos antibióticos como promotores del crecimiento debe generalizarse a nivel mundial y se debe acompañar de nuevas medidas que ayuden a controlar el uso de antibióticos (WHO, 2012).

Al igual que en medicina humana, en medicina veterinaria, la aparición de los antibióticos como tratamiento de infecciones supuso un punto de inflexión y estos son usados tanto en ganadería como en clínica veterinaria para animales de compañía, ayudando al desarrollo y diseminación de resistencias bacteriana a antibióticos. Como se indicó en el punto anterior, las resistencias bacterianas

pueden llegar a los humanos mediante el consumo de alimentos con un tratamiento térmico deficiente, por contaminación cruzada o incluso mediante la contaminación del ambiente (Verraes et al., 2013; WHO, 2012).

El principal problema es que a nivel global en la mayoría de los países no existen mecanismos de monitorización y vigilancia de las resistencias a los antibióticos en animales; y además los sistemas de monitorización son difícilmente comparables (WHO, 2012). Además de extender las limitaciones de uso de antibióticos como promotores de crecimiento, debemos focalizar en la reducción de su uso clínico para lo que se antoja esencial la mejora de la salud de la población animal y en este sentido la inmunización frente a infecciones de alta prevalencia en cada zona parece ser la vía más adecuada. En general, la mejora en la salud animal no parece ser suficiente, debido al uso de antibióticos como profilácticos en ocasiones sin pruebas claras de su efectividad, por lo que estamejoradebe de estar acompañada por nuevas reglamentaciones que promuevan el uso adecuado de los antibióticos y que incidan en la reducción del uso de las mismas clases de antimicrobianos en medicina humana y en animales de producción alimentaria (WHO, 2012).

Por todo lo expuesto es urgente encontrar alternativas viables al uso de antibióticos en ganadería, entre estas alternativas podemos destacar (WHO, 2012):

- Aditivos alimentarios: La adición de prebióticos pueden estimular la producción de metabolitos beneficiosos para el hospedador o disminuir la supervivencia de patógenos en el intestino. No obstante, por ahora las investigaciones que evalúan su uso en estos aspectos no han arrojado resultados concluyentes.
- Fagos: El uso de virus bacterianos para que ataquen a una determinada bacteria. Esto puede tener el inconveniente de que podrían ser

neutralizados por el sistema inmune del hospedador si se usan de forma repetida, también pueden surgir resistencias a los fagos o incluso se podrían transferir factores de virulencia o genes de resistencia desde el fago a la bacteria que pretendemos eliminar.

- Vacunas: Como se ha apuntado anteriormente, la disminución de las infecciones prevalentes en una zona conllevaría una disminución inmediata del uso de antimicrobianos frente a las bacterias causantes de dicha infección.

No hay una alternativa clara al uso de los antibióticos pero, podemos destacar las dos últimas ya que pese a su alta especificidad frente a determinadas bacterias no causan desórdenes en la microbiota intestinal de los animales (Allen et al., 2012).

5. La virulencia

Podemos definir la virulencia bacteriana como una medida cuantitativa de la patogenicidad, midiendo la cantidad de microorganismos que son necesarios para que produzcan una infección patógena en el organismo hospedador, es decir, la virulencia mide el grado de patogenicidad de las bacterias (Sánchez, 2011; Weigel et al., 2003).

5.1. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son aquellos mecanismos que poseen las bacterias que les permiten invadir las células de hospedadores, adherirse a las mismas (Meylan et al. 2006), colonizarlas, evadir el sistema inmune (Diacovich & Gorvel, 2010) y, por último, causar daños en los tejidos para conseguir los nutrientes que necesitan para su multiplicación. En general, podemos decir que el factor de virulencia es un componente microbiano que favorece el crecimiento o la supervivencia durante la infección (Tortora et al., 2007; Wu et al., 2008)

Para poder comprender con claridad los diferentes mecanismos de virulencia bacteriana agruparemos los mismos en dos fases según en el momento en el que son necesario: Fase temprana y Fase tardía, podemos ver un resumen de esta clasificación en la siguiente tabla.

Tabla 5. Estrategias y factores de virulencia bacteriana clasificados en fase temprana y fase tardía.

Fase	estrategia	factor de virulencia
Temprana	Adherencia:	Adhesinas fimbriales y no fimbriales. Internalización en células M.
	Movilidad y Quimiotaxis:	Flagelos, fimbrias.
	Invasión por disparo o cierre:	Sistema de secreción tipo III, Jeringas moleculares. Efectores de mimetismo molecular.
Tardía	Supervivencia intracelular:	Sideróforos. Efectores de mimetismo molecular.
	Movilidad intracelular:	Efectores de escape vacuolar y de unión a componentes del citoesqueleto.
	Evasión de la respuesta inmune y variación antigénica:	Cápsula, modificación de la envoltura celular, proteínas similares a inmunoglobulinas. Alteración y/o ausencia de presentación inmunológica.
	Sometimiento y confrontación:	Uso y modificación de las enzimas hospederas, proteasas de IgAs, adherencia a receptores alternativos.

Fuente. (modificado de Cárdenas-Perea et al., 2014)

5.1.1. Mecanismos de fase temprana

Pese a que algunas bacterias pueden causar enfermedad sin penetrar en el hospedador (caries dental o acné), podemos decir que la mayoría de las bacterias necesita entrar en el organismo del hospedador para ser patógena (Murray et al., 2009). Las vías por dónde estas bacterias pueden entrar en el hospedador se denominan puertas de entrada (Meylan et al., 2006).

Hay diversas vías de entrada cómo son las mucosas, la piel o la vía parenteral, pero penetrar en el organismo del hospedador no garantiza que puedan causar enfermedad ya que la aparición de las manifestaciones clínicas depende de muchos factores uno de los cuales es la vía de entrada, cada microorganismo tiene una puerta de entrada preferente y específica para causar la enfermedad (Meylan et al., 2006), así si bacterias que causan enfermedad al ser tragadas como *Salmonella entérica* no producirá ningún tipo de síntoma si penetran por otra vía como, por ejemplo, aspiradas (Tortora et al., 2007).

Adherencia

Una vez dentro del organismo del hospedador las bacterias deben fijarse a los tejidos en la puerta de entrada predilecta de cada una, para lo que disponen de diversos medios. Este proceso de fijación se llama adherencia y es imprescindible para que una bacteria sea patógena, ya que si no se fijasen serían eliminadas mediante secreciones que bañan los diferentes tejidos (Wu et al., 2008).

Para poder fijarse a la superficie del tejido del organismo hospedador las bacterias disponen de unas moléculas en su superficie que se denominan adhesinas o ligandos y que se unen de forma específica a unos receptores complementarios del tejido del hospedador (Meylan et al., 2006).

Adhesinas

Son lectinas (proteínas con afinidad por los azúcares) y su función es la adherencia, la mayoría de las bacterias pueden expresar más de un tipo de

adhesina y pueden encontrarse en el glucocáliz o en otras estructuras de la superficie de los microorganismos, como por ejemplo los pili, los flagelos o las fimbrias, se denominan fimbriales por su estructura (Klausen et al., 2003). Sin embargo, algunas adhesinas pueden no estar en fimbrias y estas se denominan adhesinas afrimbriales (proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Murray et al., 2009).

Biofilms o biopelículas

Las bacterias tienen la capacidad de agruparse en comunidades constituyendo masas de bacterias capaces de fijarse a superficies, tanto de organismos vivos como superficies inertes, que generalmente deben de estar húmedas y tienen que disponer de materia orgánica. Estas comunidades, que han llegado a compararse con ciudades de microorganismos, se denominan biopelículas y los microorganismos presentes en ellas cooperan en el mantenimiento de esta infraestructura en una relación simbiosis (Klausen et al., 2003; Murray et al., 2009).

Estas biopelículas representan un mecanismo de adherencia y tienen gran importancia porque confieren resistencias a desinfectantes y antibióticos, como ya se ha mencionado en puntos anteriores (Klausen et al., 2003).

Unión e internalización de células M

Las células M son células del epitelio especializadas y representan entorno al 10% de la totalidad de las células que están presentes en las placas de Preyer del intestino delgado (Yu et al., 2010). La principal función de estas células es la absorción de partículas desde la luz intestinal y transportarlas a la región vasolateral donde se encuentran linfocitos y otras células del sistema inmune. Debido a la naturaleza endocítica de las células M, algunas bacterias con la capacidad de unirse a ellas son internalizadas y transportadas al tejidos linfoide, siendo las células M la puerta de entrada de algunos microorganismos a los tejidos profundos

Movilidad y Quimiotaxis

Movilidad bacteriana

Es la capacidad bacteriana de poder desplazarse de forma aleatoria por medio de flagelos. Los flagelos son apéndices largos fijados a la célula por un extremo y libres por el otro, constituidos por subunidades proteicas llamadas flagelina (González-Pedrajo & Dreyfus, 2003).

Quimiotaxis

Es la capacidad de las bacterias de guiarse hacia un gradiente químico mediante un sistema de transducción de señales. Esta capacidad hace que las bacterias puedan dirigirse hacia gradientes químicos con sustancias que les atraen como la superficie de la mucosa, teniendo mayor posibilidad de contactar con ella, muchas de las bacterias que colonizan el intestino delgado presentan esta característica (González-Pedrajo & Dreyfus, 2003).

Fimbrias

Son apéndices que consisten de subunidades de proteínas que están ancladas en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Las fimbrias pueden ser rígidas o flexibles. La función principal de las fimbrias es servir como soporte de las adhesinas, encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedera (González-Pedrajo & Dreyfus, 2003).

Invasión por cierre o disparo (sistemas de secreción de las bacterias)

La invasión bacteriana es el proceso por el cual un microorganismo penetra al citoplasma de células no fagocíticas (células epiteliales o endoteliales), se replica dentro de estas, se propaga a células adyacentes y finalmente destruye a las células (Flannagan et al., 2009).

Algunas bacterias Gram-negativas patógenas han desarrollado mecanismos para transferir proteínas codificadas en su cromosoma a células eucariotas, estos sistemas se denominan sistemas de secreción de proteínas y se considera un mecanismo de virulencia determinante de la infección bacteriana. Estas bacterias utilizan las fimbrias para unirse a las células e inyectan proteínas efectoras capaces de polimerizar la actina celular, estimulando de esta forma a la célula para que se invagine y capte las bacterias mediante el mecanismo de cierre o disparo, esto permite a las bacterias penetrar en esta célula y, mediante el mismo sistema, pasar a la célula adyacente (Lloyd et al., 2002).

Los sistemas de secreción de proteínas presentes en las bacterias Gram-negativas se clasifican en seis grupos llamados sistemas de secreción tipo I, II, III, IV, V y VI, esta clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte (González-Pedrajo & Dreyfus, 2003; Lloyd et al., 2002).

Estos sistemas de secreción están presentes en especies bacterianas como *Salmonella entérica* serovarTyphi, *Shigella* ssp. y *Escherichia coli*. Estos seis grupos de sistemas de secreción se pueden dividir a su vez en dos grandes clases en función del mecanismo que utilizan para el transporte a través de la membrana plasmática, pudiendo ser vías sec-dependientes o vías Sec-independientes dependiendo de si utilizan el sistema de secreción denominado Sec o pueden traslocar los sustratos directamente desde el citosol, respectivamente.

El sistema V o de autotransportadores es una vía Sec-dependiente debido a que utiliza la maquinaria Sec para atravesar la membrana interna; sin embargo, debe hacerse notar que las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular; como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. Los miembros del sistema de secreción Sec-independiente son SSTI, SSTIII, SSTIV (Lloyd et al., 2002).

5.1.2. Mecanismos de fase tardía

Supervivencia intracelular

Sideróforos

Las bacterias necesitan hierro para crecer, pero la concentración de hierro libre en el organismo es relativamente baja y está, en su mayor parte, unido a unas proteínas transportadoras del hierro como, por ejemplo, la transferrina.

Para poder captar hierro libre las bacterias secretan unas proteínas llamadas sideróforos que quelan el hierro con alta afinidad, una vez que el hierro es atrapado por estas proteínas de bajo peso molecular el complejo hierro-sideróforo es captado por receptores de sideróforos que se encuentran en la superficie bacteriana, se internaliza y se incorpora a la bacteria. Existen tres tipos de sideróforos: catecoles, hidroxamatos y una combinación de ambos.

Algunas bacterias presentan una alternativa a los sideróforos que le permiten adquirir hierro, esta alternativa consiste en receptores que se unen directamente a las proteínas transportadoras de hierro y hemoglobina. Además, algunas bacterias producen toxinas cuando captan concentraciones bajas de hierro. Las toxinas causan muerte en células vecinas y liberan hierro, que entonces queda disponible (Lambris et al., 2008; Zipfel et al., 2007).

Mimetismo molecular

Es la capacidad de una especie u organismo para parecerse a otro con la intención de obtener una ventaja competitiva. Se conoce que algunos microorganismos patógenos tienen los mismos epítotos que algunos autoantígenos lo que provoca que el sistema inmune del organismo infectado ataque a sus propios tejidos (Lambris et al., 2008; Zipfel et al., 2007).

Movilidad intracelular

Una vez que se ha conseguido la internalización algunas bacterias pueden usar la actina para impulsarse a través del citoplasma de la célula infectada y propagarse hacia célula vecinas (Weigel et al., 2003). Esto se consigue fabricando lo que se denomina como cola de cometa de actina polimerizada y se forma mediante mecanismos de condensación y ensamble de actina en alguno de los extremos de la bacteria (Gouin et al., 1999). Algunos ejemplos de bacterias que poseen este factor de virulencia son *Escherichia coli* enteropatógena y *Shigella* ssp.

Evasión de la respuesta inmune y variación antigénica

Cápsula

La función de la cápsula bacteriana es proteger a la bacteria de la respuesta inmune del organismo hospedador, es decir, de la activación del complemento y de la muerte mediada por fagocitosis. La cápsula constituye el antígeno K o capsular.

Es una red de polímeros que cubre la superficie bacteriana y, en la mayoría de los casos, está compuesta por polisacáridos. Si la estructura de polisacáridos de la cápsula forma una capa homogénea y uniforme alrededor de la totalidad del cuerpo bacteriano se conoce como cápsula, si por el contrario los polisacáridos se disponen en una red de trabéculas formando una malla alrededor de la bacteria se conoce como glicocalix (Murray et al., 2009).

Variación en los antígenos de superficie

La respuesta inmune del organismo se basa en la producción de anticuerpos que se unen de forma específica a los antígenos de las bacterias y los inactivan y destruyen, como mecanismo de defensa ante este sistema defensivo muchas bacterias pueden alterar los antígenos presentes en su superficie de modo que cuando el organismo reconoce los antígenos de una bacteria y comienza a

producir la respuesta inmune, esta altera sus antígenos para que no sean reconocidos por los anticuerpos.

El proceso mediante el cual las bacterias alteran los antígenos se llama variación antigénica e involucra la activación de genes alternativos de la bacteria (Finlay & McFadden, 2006; Lambris et al., 2008).

Sometimiento y confrontación

Uso y modificación de las enzimas hospederas

Algunas bacterias utilizan a la propia célula del hospedador invadido para obtener nutrientes y generar residuos, es decir la virulencia de algunas células es facilitada por la producción de enzimas extracelulares y sustancias relacionadas. Un ejemplo es la colagenasa y la hialuronidasa que degradan el colágeno y el ácido hialurónico, respectivamente, lo que facilita que la bacteria se disperse a través de los tejidos (Finlay & McFadden, 2006).

Otro ejemplo sería la enzima coagulasa, producida por *Staphylococcus aureus* y que acelera la formación de coágulos de fibrina, lo que protege a la bacteria de la fagocitosis, separando el área infectada cubriéndola con una capa de fibrina.

Algunas bacterias generan a su vez residuos conocidos como toxinas, estas pueden ser exotoxinas (tipo A-B, proteolíticas, alterantes de membrana) o endotoxinas. Las exotoxinas son polipéptidos que son liberados por la célula, mientras que las endotoxinas son lipopolisacáridos que forman parte integral de la pared celular. Las endotoxinas se encuentran solamente en bacilos y cocos Gram-negativos; no son liberados activamente de la célula y causan fiebre, shock y otros síntomas generalizados (Pallen & Wren, 2007).

Proteasa contra IgA secretora.

Un mecanismo defensivo del organismo es la producción de mucina, la viscosidad de la mucina es causada en parte por las moléculas de inmunoglobulina secretoria A (sIgA) que se unen simultáneamente a antígenos bacterianos y la interacción con la mucina por medio de sus porciones Fc. Una estrategia bacteriana para evitar ser atrapada en la capa de mucina es la producción de una enzima extracelular que rompe la IgA humana en la región de la bisagra. Este rompimiento separa la parte de la sIgA que se une a la bacteria, de la parte que interactúa con la mucina. La importancia de que ciertos géneros bacterianos produzcan esta proteasa de sIgA radica en que dichas bacterias pueden colonizar las superficies mucosas con mayor facilidad que aquellas que no producen la proteasa de sIgA (Finlay & McFadden, 2006; Pallen & Wren, 2007).

OBJETIVOS

La resistencia a los antibióticos es un grave problema derivado del uso, en concreto del uso excesivo y del mal uso, de los mismos, que aparece prácticamente desde el comienzo de su utilización al principio de los años 50 y que ocasiona grandes perjuicios en la medicina humana debido a la aparición de infecciones por bacterias patógenos multiresistentes difíciles de tratar.

El uso de los antibióticos en producción animal agrava este problema, ya que las bacterias que han desarrollado resistencias en el ámbito de la producción alimentaria, pueden transmitir estas resistencias a bacterias comensales o patógenas de la microbiota intestinal humana mediante transmisión horizontal de elementos genéticos móviles. El abuso de los antibióticos que se ha producido en ganadería, usándolos incluso para fines diferentes a los clínicos, ha agravado la aparición de resistencias por lo que debemos seguir profundizando en medidas que limiten su uso en veterinaria para poder controlar las resistencias en medicina humana. Además, debido a la posible transmisión de bacterias no patógenas con resistencias a antibióticos mediante los alimentos y que estas resistencias pueden diseminarse posteriormente a bacterias patógenas y por la tremenda globalización del mercado alimentario estas medidas deben de ser consensuadas a nivel mundial.

Dentro de la industria alimentaria, la producción cárnica se considera uno de los principales focos de concentración de microorganismos que pueden transmitirse a los humanos al considerarse que las bacterias encuentran en la carne unas condiciones óptimas de actividad del agua y composición físico-química que favorecen su supervivencia y multiplicación. Los mataderos son el primer eslabón de la cadena alimentaria, lo que los convierte en la primera frontera entre los animales vivos y el alimento final, por lo que establecer un mapeo de las diferentes bacterias resistentes que podemos encontrar en cada fase de producción del matadero y el comportamiento de estas en cada uno de ellas es fundamental para poder reducir su propagación y su impacto en el

alimento final, además el ambiente del matadero presenta una condiciones idóneas para que las bacterias adquieran resistencias que posteriormente diseminen entre las diferentes cepas a lo largo de la cadena de producción hasta el producto final.

Por lo tanto, conocer los mecanismos que utilizan las bacterias para adquirir resistencias a los diferentes grupos de antibióticos y profundizar en cómo se diseminan estas resistencias de forma horizontal y relacionarlas con la virulencia de las propias cepas bacterianas se antoja fundamental para poder establecer medidas adecuadas que ayuden a limitar la aparición de resistencias.

El uso de desinfectantes biocidas en la industria alimentaria es de gran ayuda para descontaminar las superficies de trabajo, no obstante, puede favorecer la aparición de resistencias a los antibióticos en bacterias ya que los mecanismos de resistencias a ambos productos son similares, además las agrupaciones de bacterias en biopelículas hace que determinados biocidas no sean efectivos por lo que es necesario desarrollar nuevas técnicas o productos que por un lado puedan penetrar en las biopelículas de microorganismos y por otro eviten la aparición de resistencias cruzadas entre antibióticos y otros biocidas.

Por todo lo desarrollado anteriormente se establecen una serie de objetivos que enumero a continuación:

1. Determinar la carga microbiana total y de patógenos en las superficies del matadero y de los animales.
2. Determinar los resistomas tanto en superficies del matadero como de los animales y los productos finales.
3. Correlación entre los resistomas de superficies del matadero y de los animales (y sus productos) mediante un análisis estadístico de los datos.
4. Determinar los genes de resistencia prevalentes en un matadero de carne.

5. Determinar los genes de virulencia presentes en un matadero de carne.
6. Plantear nuevas estrategias prácticas que deben ser aplicadas para evitar la diseminación de la resistencia y de la virulencia hasta el producto final.

TRABAJO EXPERIMENTAL

ARTÍCULO 1

Descifrando la diversidad de resistomas y virulomas en un matadero porcino y sus productos cárnicos a lo largo de la Cadena de producción de la carne.

Deciphering Resistome and Virulome Diversity in a Porcine Slaughterhouse and Pork Products Through Its Production Chain.



Deciphering Resistome and Virulome Diversity in a Porcine Slaughterhouse and Pork Products Through Its Production Chain

Guillermo Campos Calero¹, Natacha Caballero Gómez¹, Nabil Benomar¹, Beatriz Pérez Montoro¹, Charles W. Knapp², Antonio Gálvez¹ and Hikmate Abriouel^{1*}

¹ Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Jaén, Spain, ² Centre for Water, Environment, Sustainability & Public Health, Department of Civil and Environmental Engineering, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

David Rodriguez-Lazaro,
University of Burgos, Spain

Reviewed by:

Ana P. Tedim,
NEIKER-Tecnalia, Spain
Michael P. Ryan,
University of Limerick, Ireland

*Correspondence:

Hikmate Abriouel
hikmate@ujaen.es

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 24 May 2018

Accepted: 16 August 2018

Published: 12 September 2018

Citation:

Campos Calero G,
Caballero Gómez N, Benomar N,
Pérez Montoro B, Knapp CW,
Gálvez A and Abriouel H (2018)
Deciphering Resistome and Virulome
Diversity in a Porcine Slaughterhouse
and Pork Products Through Its
Production Chain.
Front. Microbiol. 9:2099.
doi: 10.3389/fmicb.2018.02099

We aimed to better understand resistome and virulome patterns on animal and process-area surfaces through a pig slaughterhouse to track possible contamination within the food production chain. Culture-dependent methods revealed high levels of microbial contamination, corresponding to mesophilic and pathogenic bacteria on both the animal and process-area surfaces mainly in the anesthesia (AA and AS) zone followed by “scorching and whip” (FA and FS) zone and also in the end products. To evaluate the potential risk of antibiotic resistance and virulence determinants, shotgun metagenomic DNA-sequencing of isolates from selected areas/products uncovered a high diversity and richness of antibiotic resistance genes (ARGs): 55–62 genes in the anesthesia area (AA and AS) and 35–40 in “animal-arrival zone” (MA and MS). The “scorching and whip” (FA and FS) area, however, exhibited lowered abundance of ARGs (1–6), indicating that the scalding and depilating process (an intermediate zone between “anesthesia” and “scorching and whip”) significantly decreased bacterial load by 1–3 log₁₀ but also diminished the resistome. The high prevalence of antibiotic-inactivating enzyme genes in the “animal-arrival zone” (60–65%) and “anesthesia” area (56%) were mainly represented by those for aminoglycoside (46–51%) and lincosamide (14–19%) resistance, which did not reflect selective pressures by antibiotics most commonly used in pig therapy—tetracyclines and beta-lactams. Contrary to ARGs, greater number of virulence resistance genes were detected after evisceration in some products such as kidney, which reflected the poor hygienic practices. More than 19 general virulence features—mainly adherence, secretion system, chemotaxis and motility, invasion and motility were detected in some products. However, immune evasion determinants were detected in almost all samples analyzed from the beginning of the process, with highest amounts found from the anesthesia area. We conclude that there are two main sources of contamination in a pig slaughterhouse: the microorganisms carried on the animals’ hide, and those from the evisceration step. As such, focussing control measures, e.g., enhanced disinfection procedures, on these contamination-source areas may reduce risks to food safety and consumer health, since the antibiotic and virulence determinants may spread to end products and the environment; further, ARG and virulence traits can exacerbate pathogen treatments.

Keywords: antibiotic resistance, slaughterhouse, resistome, virulome, bacteria

INTRODUCTION

Antibiotic resistance is a natural phenomenon, ancient, highly diverse and globally distributed (Hecker et al., 2003; Davies and Davies, 2010; Pawlowski et al., 2016), which has become elevated during the antibiotic era. Consequently, the selective pressure exerted by antibiotics has dramatically increased drug-resistant bacteria (pathogens and commensals) (Fair and Tor, 2014). The use, misuse and abuse of antibiotics in veterinary, agriculture and clinical therapy for decades have increased the prevalence of resistance genes (ARGs), especially the acquired resistance elements by horizontal gene transfer into the human and animal microbiomes (Laxminarayan, 2014). Additionally, these resistance determinants present on mobile genetic elements have increased the risk of their transfer between different ecosystems. Despite the increasing concerns over inappropriate use of antibiotics in veterinary medicine and food production, slaughterhouse and meat products remain potential reservoirs of antimicrobial resistant bacteria (ARB) and antimicrobial resistance genes (Lavilla Lerma et al., 2013, 2014a,b; Zhu et al., 2013). Consequently, ARB and ARGs can spread to humans throughout the food-supply chain (e.g., Antibiotic Resistance from the Farm to the Table, 2014) by exposure via contaminated animals, meat products, or natural environment (i.e., air, water, and soil) (Founou et al., 2016).

As such, the slaughterhouse environment poses as a potential source and dissemination route for ARGs and ARB contamination. Several steps in the slaughterhouse production system could play crucial roles in the transmission of antimicrobial resistance (AMR) to humans via environmental interfaces and meat products. Preslaughter conditions (e.g., feeding and stabling) can become contaminated via skin and feces, and adherence features in bacteria such as attachment and their biofilm formation capacity can enhance the cross-contamination potential (Koo et al., 2013). Thus, contamination with antibiotic resistant bacteria may occur, increasing the risk of antibiotic resistance gene spread during subsequent slaughtering processes and end products. Within the slaughterhouse, bleeding, evisceration and other related processes can contaminate carcasses and equipment, leading to the spread of gut bacteria (Lavilla Lerma et al., 2013). The gut microbiome often becomes particularly problematic since they represent a complex ecosystem and a epicenter of horizontally transferrable resistance traits between commensals and pathogens (Carlet, 2012), and as such, they cross-transmit resistant strains between animals and humans (Leverstein-van Hall et al., 2011; Overdevest et al., 2011; Economou and Gousia, 2015). On the other hand, the transfer of antibiotic resistance from human to animals may also occur due to the some interconnection process between ecosystems. Further, many commonly used biocides for disinfection procedures (Chuanchuen et al., 2001; Gilbert et al., 2002) promote cross-resistance with antibiotics due to their action on common targets (Lavilla Lerma et al., 2014a,b); thereby shifting bacteria from having a single resistance trait leading to the selection of multidrug- or pan-drug resistant bacteria (Magiorakos et al., 2012).

Advanced molecular technologies, such as metagenomic sequencing to detect and quantify resistome-virulome of an entire microbial population (Baquero et al., 2013), allow us to predict, prevent and manage antibiotic resistance and virulence determinants in several environments (Noyes et al., 2017). This remains an excellent methodological approach for determining types and abundances of ARGs and virulence elements, which can further provide information about the cumulative proliferation of antibiotic resistance within a system (Luby et al., 2016). In this study, shotgun metagenomic sequencing of cultured isolates from different process-area and animal surfaces, and the resulting meat products, was conducted to determine the microbial and the resistome-virulome diversity throughout a pig slaughterhouse in Jaén (Spain). It remains crucial to understand and localize the focus of resistant and virulent bacteria in a slaughterhouse to reduced their spread and impact on the environment.

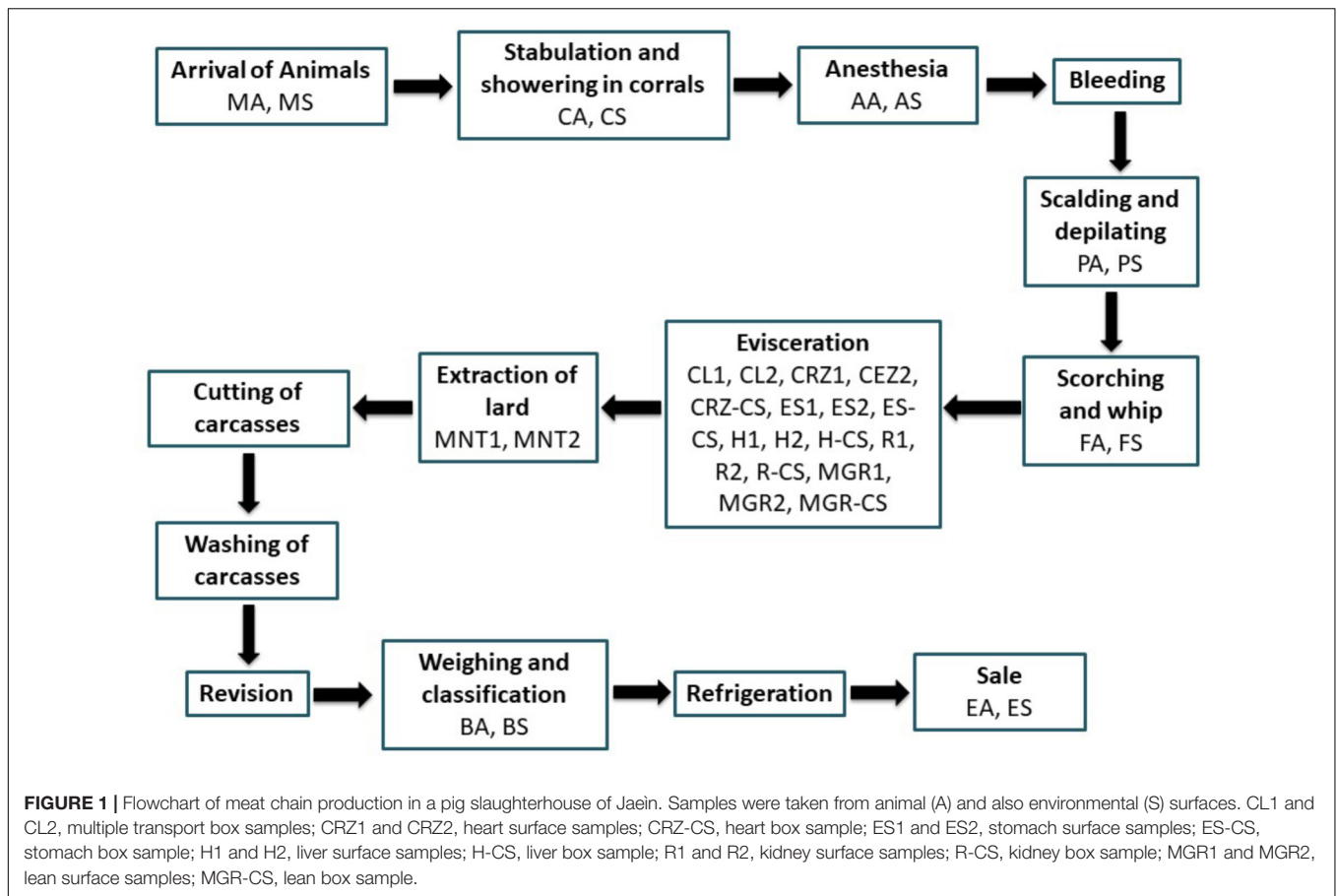
MATERIALS AND METHODS

Sample Collection and Processing

This study involved sample isolates collected from a local pig slaughterhouse (Jaén, Spain), which is representative of those in the region and receives animals from multiple suppliers and geographic locations. Different samples were collected with sterile swabs from the animals' backs (A; or equivalent surfaces) and also environmental surfaces (S) from the following zones (**Figure 1**): "animal arrival" (MA, MS), stabling and corral showers (CA, CS), anesthesia (AA, AS), "scalding and depilating" (PA, PS), "scorching and whip" (FA, FS), evisceration (several samples) and extraction of lard (MNT1, MNT2), "weight and classification" (BA, BS) and sale (EA, ES). For animal products, only the surface was swabbed. The samples were immediately stored and transported to the laboratory under refrigerated conditions.

Microbiological Analyses of Culturable Microbiota

The presence of various groups of bacteria throughout meat production chain were determined from animal and slaughterhouse surfaces: total aerobic mesophilic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., pseudomonads and lactic acid bacteria (LAB) (Lavilla Lerma et al., 2013). Sterile swabs were used to collect samples (100 cm²) from the selected sites (described above) being this operation repeated eight times; they were then immersed each one in 1 ml of sterile saline solution (0.85%; Scharlab, Barcelona, Spain) and stored at 4°C for 24 h to release bacteria from swabs while minimizing growth. Then, samples (eight replicates) were pooled to provide a representative microbiota community from each zone, and they were then serially diluted in sterile saline solution and plated in triplicate on the following media: Tryptone Soya Agar "TSA" (Scharlab, Barcelona, Spain) for estimation of total aerobic mesophilic bacteria, Baid Parker Agar "BPA" (Scharlab, Barcelona, Spain) for staphylococci, Palcam Agar "PA" (Scharlab, Barcelona, Spain)



for *L. monocytogenes*, TBX (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for *E. coli*, XLD (Scharlab, Barcelona, Spain) for *Salmonella* sp., King Agar “KA” (Scharlab, Barcelona, Spain) for pseudomonads (King et al., 1954), “MRSA” (Scharlab) supplemented with 0.4 g/l sodium azide (Scharlab, Barcelona, Spain) for LAB (Ahn et al., 2002). Counts from the different inoculated media were obtained after 48 h of incubation at 37°C (TSA, BPA, PA, TBX, XLD) and after 72 h of incubation at 30°C (MRSA) and 22°C (KA). Results were calculated as the mean of three determinations.

Resistome Determination in Pig Slaughterhouse Throughout Meat Production Chain

Total DNA Extraction

The pooled saline samples, as previously mentioned, were used for DNA community analysis. The following animal/environmental samples were selected for their microbial contamination and because they represented slaughterhouse sufficient processes to gain an image of antibiotic resistance spread: “animal arrival” (MA and MS), anesthesia (AA from and AS), “scorching and whip” (*chamuscado y flagelado*, FA and FS), evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2), and sale (EA and ES) zones. Bacterial samples, following 24 h incubation at 4°C, were centrifuged (14000 rpm for 10 min), and the DNA were extracted using ZymoBIOMICS DNA Miniprep

Kit (Zymo Research, California, United States) according to the manufacturer’s instructions. Total DNA quantification and quality were assessed by a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). DNA samples were frozen at –80°C until required.

Construction of Metagenomic Libraries

Construction of the metagenomic libraries was done using the Illumina Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, United States) according to the manufacturer’s instructions. The resulting DNA was pooled by equivalent weight. Library sequencing was done in NextSeq 500 platform (2 × 150 bp read lengths) at Lifesequencing S.L. (Valencia, Spain). The resulting reads were assembled using SPAdes program version 3.10. Assembly and annotation were done at Lifesequencing S.L. (Valencia, Spain). The mean coverage for the kmer 99 ranged between 1.68 and 6.35.

Antibiotic Resistance Gene Detection

The predicted CDSs (coding DNA sequences) were annotated using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) against the CARD’s (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) curated AMR (antimicrobial resistance) database with the aim to detect antibiotic resistance genes (ARG) using Resistance Gene Identifier RGI v3.2.1 (as part of CARD tools). Furthermore, the RGI software (RGI 3.2.1) used for prediction of resistome from

protein or nucleotide data has been based on homology and SNP (Single Nucleotide Polymorphism) models. Resistome sequences have been deposited at the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers ERX2604238 to ERX2604249.

Virulence Determinant Detection

The predicted CDSs were annotated by using reciprocal BLAST and VFDB (Virulence Factors of Bacterial Pathogens) database. Obtained hits were considered positive when the results of reciprocal BLAST were similar, with a 80% sequence similarity cut-off. Virulome sequences has been deposited at the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers ERX2604238 to ERX2604249.

Statistical Analyses

All analyses were performed in triplicate. Statistical analyses were conducted using Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, United States) program to determine averages and standard deviations. Statistical treatment of data was conducted by analysis of variances (ANOVA) in Statgraphics Centurion XVI software using Shapiro–Wilk test and the Levene test to check data normality and the 2-sided Tukey’s test to determine the significance of differences between strains, where $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Microbial Diversity in a Pig Slaughterhouse Throughout Meat Chain Production

Culture dependent-methods revealed many populations from several bacterial groups recovered from animal and environmental surfaces of a pig slaughterhouse and meat processing plant in Jaén (Figure 1 and Table 1). The largest number of mesophilic bacteria was recovered from the first steps of slaughtering like stabling and showers (CA, CS), anesthesia (AA, AS), and “scorching and whip” (FA, FS) and approached $7.71 \log_{10}$ CFU/ml (Table 1). No differences were detected between animal and environmental/processing surfaces (counts ranging from 4.41 – $7.71 \log_{10}$ CFU/ml); however, no bacteria were recovered from the final step of meat production before shipment, i.e., the surface within the sale zone (ES). The counts of pseudomonads recovered from animal and process-area surfaces were similar, ranging from 3.84 to $7.48 \log_{10}$ CFU/ml with the lowest counts in “weights and classification” (BA, BS) and sale (EA, ES) zones (Table 1). Staphylococci were also detected in all samples (animal and environment) ranging from 3.21 to $7.15 \log_{10}$ CFU/ml and, in a similar manner, the lowest counts were registered in “weight and classification” (BA, BS) and sale (EA, ES) zones (Table 1). Regarding *L. monocytogenes*, this pathogen was highly recovered from animal surface in anesthesia (AA) zone and process surfaces in “scorching and whip” (FS) reaching 5.77 and $6.30 \log_{10}$ CFU/ml, respectively (Table 1). However, the lowest counts were registered in animal surface from “animal-arrival zone” (MA) ($0 \log_{10}$ CFU/ml), surfaces and animal products in the sale zone (ES and EA: $0 \log_{10}$

CFU/ml and $1 \log_{10}$ CFU/ml, respectively) (Table 1). On the other hand, *E. coli* was detected in all animal and process-area surfaces except on animal surfaces following “scalding and depilating” (PA) and on the surfaces in the sale zone (ES: $0 \log_{10}$ CFU/ml) (Table 1). Indeed, lower *E. coli* populations were detected on surfaces of animal products in the sale zone (EA) and environmental surfaces in “weight and classification” (BS) of 1 and $1.15 \log_{10}$ CFU/ml, respectively (Table 1). However, highest counts were obtained on animal and process-area surfaces in the anesthesia zone (AA and AS) at 5.79 – $5.91 \log_{10}$ CFU/ml (Table 1). Concerning *Salmonella* sp., animal and environmental surfaces in anesthesia zone (AA and AS) showed the most contaminated surfaces in slaughterhouse being 4.20 – $5.30 \log_{10}$ CFU/ml (Table 1). However, *Salmonella* sp. was absent in animal surface of Arrival of Animals zone (MA), animal surface of “scalding and depilating” zone (PA), animal and environmental surfaces of “scorching and whip” (FA and FS) and sale (EA and ES) zones (Table 1). Lactic acid bacteria were detected in all zones especially on animals in anesthesia and process-area surfaces (AA and AS) and animal surfaces in “stabling and corral showers” (CA) ranging from 6.64 to $6.8 \log_{10}$ CFU/ml (Table 1). However, the other zones showed intermediate counts ranging from 3.4 to $5.01 \log_{10}$ CFU/ml (Table 1).

Animal products (stomach, kidney, heart, lean, and lard) obtained after evisceration and also their corresponding transport boxes (H-CS, R-CS, CRZ-CS, ES-CS, MGR-CS, CL1, and CL2) were examined for bacterial diversity in a similar manner as for animal and processing surfaces (Table 2). In general, samples from all transporting boxes exhibited greater counts of total mesophilic bacteria (ranging from 6.29 to $7.56 \log_{10}$ CFU/ml) than their corresponding products (ranging from 4.41 to $6.81 \log_{10}$ CFU/ml) (Table 2). Similar results were obtained for pseudomonads (ranging from 4.56 to $7.55 \log_{10}$ CFU/ml) (Table 2) and staphylococci (ranging from 3.25 to $6.42 \log_{10}$ CFU/ml) (Table 2). However, *L. monocytogenes* were only detected in sample R1 from kidney ($3.3 \log_{10}$ CFU/ml), sample MGR1 from lean meat ($3.02 \log_{10}$ CFU/ml) and sample MNT1 from lard ($2.38 \log_{10}$ CFU/ml) (Table 2). On the other hand, *E. coli* were detected in all product samples and also transport boxes (ranging from 2.69 to $4.83 \log_{10}$ CFU/ml) except MNT1 (lard sample) and CL1 (transport box for kidney and liver) (Table 2). *Salmonella* sp. were recovered from liver surface (H2) and its transport box (H-CS), the transport box of kidney (R-CS), the stomach (ES1), the transport box of lean (MGR-CS) and the transport box (CL2) for several organs (heart, stomach, and lean) being the counts ranging from 2.23 to $3.65 \log_{10}$ CFU/ml (Table 2). Regarding LAB, they were present in all animal products and transport boxes (ranging from 3.41 to $6.17 \log_{10}$ CFU/ml) except the transport box CL1 used for kidney and liver (Table 2).

Determination of Resistome Throughout Meat Chain Production

To assess the resistome throughout the meat production chain in a pig slaughterhouse, we collected pooled samples from animal (or product) surfaces and process surfaces from five

TABLE 1 | Microbial counts in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

Culture media	Microbial counts in animal and environmental surfaces (CFU/ml)*						
	MA	MS	CA	CS	AA	AS	PA
TSA	5.26 ± 0.07 ^d	5.46 ± 0.17 ^d	7.05 ± 0.08 ^f	5.88 ± 0.01 ^e	7.72 ± 0.24 ^g	7.55 ± 0.38 ^g	5.87 ± 0.06 ^e
KA	5.06 ± 0.64 ^b	6.54 ± 0.13 ^{ef}	6.96 ± 0.01 ^{fg}	7.02 ± 0.36 ^{fg}	7.11 ± 0.52 ^h	7.49 ± 0.21 ^h	6.25 ± 0.10 ^{de}
BPA	5.24 ± 0.10 ^{cd}	6.16 ± 0.06 ^e	7.12 ± 0.06 ^f	6.93 ± 0.06 ^f	7.16 ± 0.58 ^f	7.02 ± 0.69 ^f	5.19 ± 0.07 ^{cd}
PA	0 ^a	2.74 ± 0.06 ^{bc}	3.54 ± 0.09 ^{bcd}	3.30 ± 0.43 ^{bcd}	5.78 ± 0.43 ^{de}	3.06 ± 0.43 ^{bc}	2.75 ± 0.21 ^{bc}
TBX	4.38 ± 0.08 ^{cd}	4.98 ± 0.26 ^{de}	4.85 ± 0.00 ^{cde}	4.74 ± 0.06 ^{cde}	5.79 ± 0.05 ^e	5.92 ± 0.44 ^e	0 ^a
XLD	0 ^a	1.50 ± 0.21 ^{ab}	3.50 ± 0.28 ^{cde}	2.48 ± 0.00 ^{bcd}	5.30 ± 0.00 ^f	4.21 ± 0.13 ^{de}	0 ^a
MRSA	4.71 ± 0.00 ^{fg}	4.78 ± 0.34 ^g	6.39 ± 0.04 ^h	5.01 ± 0.00 ^g	6.64 ± 0.21 ^{hi}	6.81 ± 0.14 ⁱ	3.55 ± 0.05 ^{ab}

Culture media	Microbial counts in animal and environmental surfaces (CFU/ml)*						
	FA	FS	BA	BS	EA	ES	PS
TSA	7.61 ± 0.05 ^g	7.08 ± 0.18 ^f	4.87 ± 0.03 ^c	4.45 ± 0.18 ^b	4.42 ± 0.16 ^b	0 ^a	5.90 ± 0.05 ^e
KA	5.71 ± 0.07 ^{cd}	7.32 ± 0.09 ^h	5.19 ± 0.06 ^{bc}	4.90 ± 0.01 ^b	4.72 ± 0.01 ^b	3.85 ± 0.01 ^a	6.16 ± 0.29 ^{de}
BPA	5.07 ± 0.10 ^{bc}	5.74 ± 0.07 ^{de}	4.53 ± 0.05 ^b	3.50 ± 0.03 ^a	3.72 ± 0.03 ^a	3.21 ± 0.24 ^a	5.43 ± 0.28 ^{cd}
PA	4.00 ± 0.06 ^{cde}	6.30 ± 0.00 ^e	2.35 ± 0.49 ^{abc}	2.50 ± 0.28 ^{abc}	1.00 ± 0.14 ^{ab}	0 ^a	3.66 ± 0.04 ^{cde}
TBX	4.64 ± 0.12 ^{cde}	3.68 ± 0.14 ^{bc}	3.06 ± 0.03 ^b	1.15 ± 0.16 ^a	1.00 ± 0.14 ^a	0 ^a	3.98 ± 0.39 ^{bcd}
XLD	0 ^a	0 ^a	1.35 ± 0.19 ^{ab}	2.24 ± 0.34 ^{bc}	0 ^a	0 ^a	1.00 ± 0.14 ^{ab}
MRSA	4.28 ± 0.11 ^{de}	4.45 ± 0.15 ^{ef}	3.89 ± 0.02 ^c	3.86 ± 0.17 ^{bc}	3.37 ± 0.16 ^a	3.41 ± 0.12 ^a	4.04 ± 0.11 ^{cd}

±SD, standard deviations of three independent experiments. *Each different lower-case letter represents significant differences according to 2-sided Tukey's HSD between strains ($p < 0.05$). AA, animal surfaces in Anesthesia zone; AS, process-area surfaces in Anesthesia zone; BA, animal surfaces in weight and classification; BS, process-area surfaces in weight and classification; CA, animal surfaces in stabling and corral showers; CS, process-area surfaces in stabling and corral showers; EA, animal surfaces in Sale zone; ES, process-area surfaces in Sale zone; FA, animal surfaces in Scorching and Whip zone; FS, process-area surfaces in Scorching and Whip zone; MA, animal surfaces in Animal Arrival zone; MS, process-area surfaces in Animal Arrival zone; PA, animal surfaces in Scalding and Depilating zone; PS, process-area surfaces in Scalding and Depilating zone.

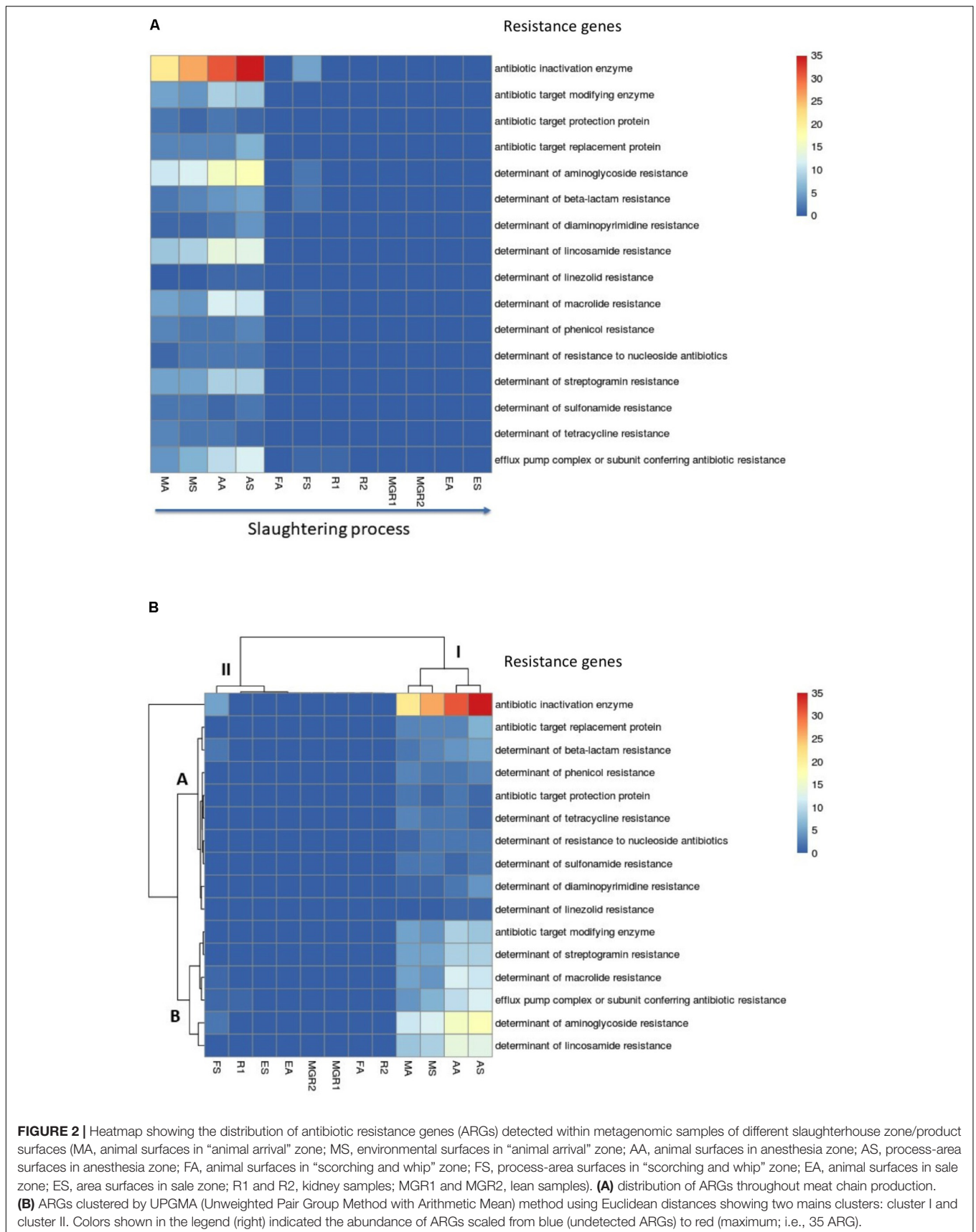
selected zones: “animal-arrival” (MA, MS), anesthesia (AA, AS), “scorching and whip” (FA, FS), evisceration (R1 and R2 kidney samples, MGR1 and MGR2 lean samples), and sale (EA, ES) (Figure 1). Heatmap (Figure 2A) demonstrates ARG abundances found in the surfaces of animals and the environment from the first steps of slaughtering, being almost absent in product surfaces (kidney and lean meat) and also sale zone (Figure 2A). Cluster analysis of ARG data showed two main clusters: cluster I, represented by “animal arrival” (MA, MS) and anesthesia (AA, AS) zones, which exhibited high diversity and richness of ARGs up to 62 ARGs (AS), 55 ARGs (AA), 40 ARGs (MS), and 35 ARGs (MA) (Figure 2B and Supplementary Material S1); however, cluster II was represented by the other zones and animal products [“scorching and whip” (FA, FS), evisceration (R1 and R2) kidney-surface samples, MGR1 and MGR2 lean-surface samples, and sale (EA, ES)] with low abundance of ARGs (Figure 2B). The lowest levels of microbiota resistome was observed in kidney surface (R1) and “scorching and whip” process surface (FS) with one ARG and six ARGs, respectively (Supplementary Material S1). Furthermore, no ARGs were detected in the rest of zone/product surfaces (EA, ES, FA, MGR1, and MGR2).

Among antibiotic resistance genes, we found 16 different mechanisms of resistance; most abundant were genes encoding for antibiotic-inactivating enzymes with up to 35 genes in AS, and 31 genes in AA, 26 genes in MS, 21 genes in MA and 5 genes in FS (Figure 2 and Supplementary Material S1). Specific genes such as aminoglycoside resistance up to 17 were detected in AS, 16 genes in AA, 12 genes in MS, 11 genes in MA and two

genes in FS (Figure 2A); and lincosamide resistance, macrolide resistance, efflux-pump complex and streptogramin resistance genes were also notably detected in AS and AA (9–14 genes), MS and MA (4–9 genes). On the other hand, FS only had the presence of one gene coding for macrolide resistance and for efflux-pump complex; however, R1 only showed the presence of one efflux-pump complex coding gene (Figure 2 and Supplementary Material S1).

Cluster analysis of ARGs further revealed that the most abundant determinant type (antibiotic-inactivating enzymes) clustered separately; however, other determinants present in slaughterhouse showed two main clusters: cluster A and cluster B (Figure 2B). Cluster A was presented by genes coding for resistance to beta-lactams, phenicols, tetracyclines, nucleoside antibiotics, sulfonamides, diaminopyrimidines and linezolid along with non-specific genes coding for antibiotic-target replacement protein and antibiotic-target protection protein (Figure 2B). Cluster B, which was the second most important in resistome cluster following those for antibiotic-inactivating enzymes, was comprised of genes encoding resistance to streptogramin, macrolides, aminoglycosides and lincosamides along with non-specific genes coding for antibiotic-modifying enzymes and efflux-pump complexes (Figure 2B).

On the other hand, the most prevalent antibiotic resistance genes were aminoglycoside (46–51%) and lincosamide (14–19%) resistance genes mainly in animal-arrival zone (MA and MS) and anesthesia area (AA and AS) (Figure 3 and Supplementary Material S1). However, tetracyclines, sulphonamides and



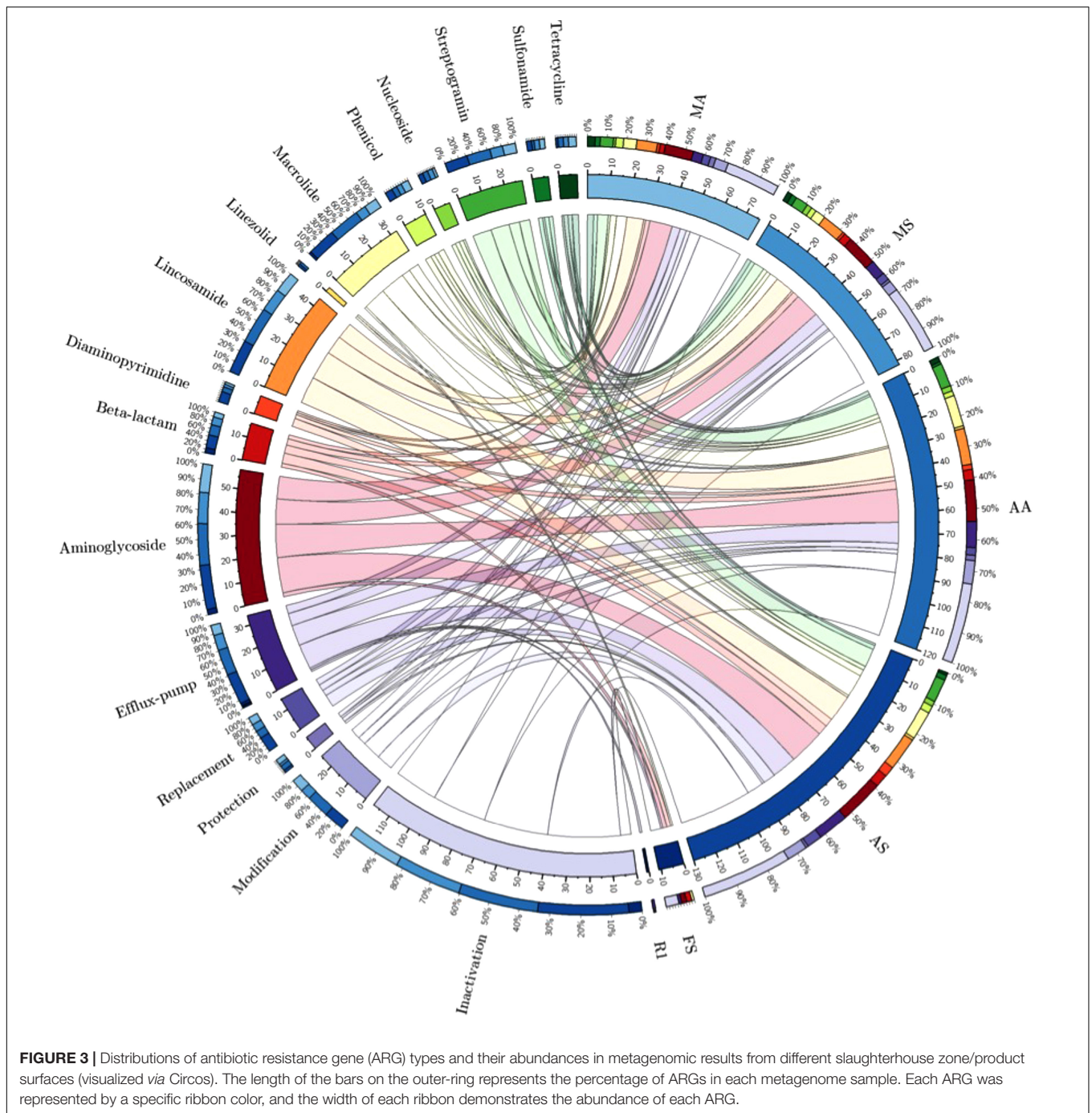


FIGURE 3 | Distributions of antibiotic resistance gene (ARG) types and their abundances in metagenomic results from different slaughterhouse zone/product surfaces (visualized *via* Circos). The length of the bars on the outer-ring represents the percentage of ARGs in each metagenome sample. Each ARG was represented by a specific ribbon color, and the width of each ribbon demonstrates the abundance of each ARG.

nucleosides resistance genes were less abundant (**Figure 3** and **Supplementary Material S1**).

Determination of Virulome Throughout Meat Chain Production

The incidence of virulence was assessed by metagenomic sequencing and compared with VFDB database. In regards to general classes of virulence determinants, R1 (kidney-surface sample) and AS (surfaces in the Anesthesia zone) exhibited

more virulence traits than other zones/products, with up to 379 determinants in R1 and 174 determinants in AS (surfaces in anesthesia zone), followed by AA (animals in anesthesia) with 56 determinants, 52 determinants in FS (surface in “scorching and whip” zone), 46 determinants in MS (surfaces in “animal arrival”) and 35 in MA (“animal arrival”) (**Figure 4A** and **Supplementary Material S2**). However, MGR1 and MGR2 surface products and FA (animal surfaces in “scorching and whip”) had only 2, 5, and 13 virulence determinants, respectively; while R2 sample and those from sale zone (EA and ES) were free of virulence factors

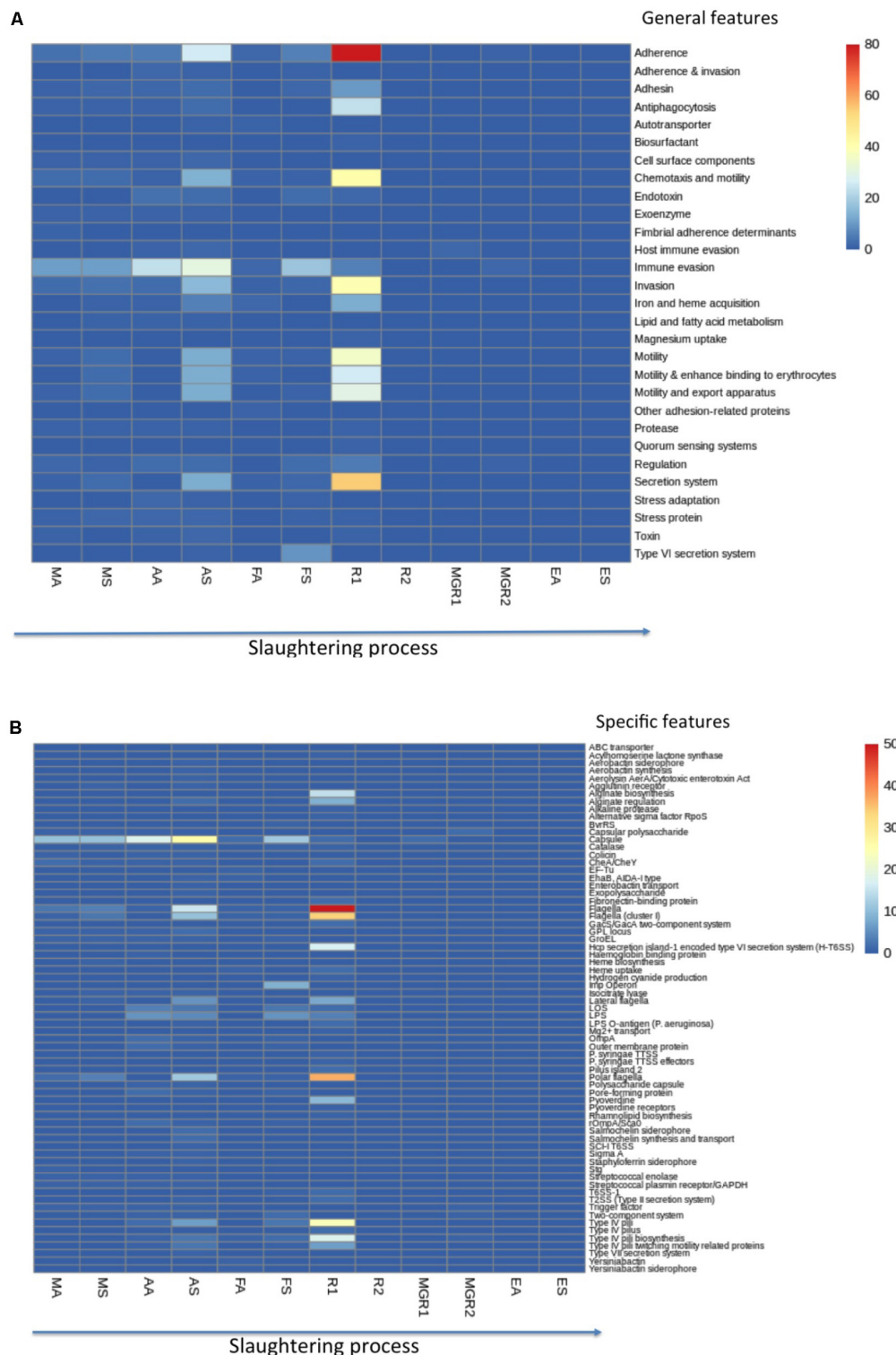


FIGURE 4 | Heatmap showing the distribution of virulence genes detected within metagenomic samples of different slaughterhouse zone/product surfaces (MA, animal surface in Animal Arrival zone; MS, environmental surfaces in “animal arrival” zone; AA, animal surfaces in anesthesia zone; AS, process-area surfaces in anesthesia zone; FA, animal surfaces in “scorching and whip”; FS, process-area surfaces in “scorching and whip”; EA, animal surfaces in sale zone; ES, area surfaces in sale zone; R1 and R2, kidney; MGR1 and MGR2, lean). **(A)** Distribution of general VRGs throughout meat chain production; **(B)** distribution of specific VRGs throughout meat chain production. Colors shown in the legend (right) indicated the abundance of VRGs scaled from blue (undetected VRGs) to red (maximum; i.e., 80 VRG).

TABLE 2 | Microbial counts in pork products through its production chain in a porcine slaughterhouse.

Culture media	Product surface (CFU/ml)*																		
	H1	H2	H-CS	R1	R2	R-CS	CRZ1	CRZ2	CRZ-CS	H1	H2	H-CS	R1	R2	R-CS	CRZ1	CRZ2	CRZ-CS	
TSA	4.86 ± 0.13 ^b	5.31 ± 0.05 ^c	6.30 ± 0.09 ^{de}	6.34 ± 0.03 ^{def}	4.41 ± 0.05 ^a	6.72 ± 0.04 ^g	6.81 ± 0.06 ^{gh}	6.41 ± 0.05 ^{ef}											
KA	7.30 ± 0.00 ^f	7.30 ± 0.00 ^f	7.30 ± 0.00 ^f	6.14 ± 0.34 ^{ef}	4.56 ± 0.04 ^a	6.80 ± 0.04 ^h	6.24 ± 0.09 ^{efg}	5.72 ± 0.17 ^d											
BPA	3.25 ± 0.07 ^a	3.64 ± 0.03 ^b	5.48 ± 0.07 ^f	4.82 ± 0.21 ^f	3.62 ± 0.01 ^b	4.98 ± 0.09 ^g	5.34 ± 0.07 ⁱ	5.03 ± 0.35 ^{fgh}											
PA	0 ^a	0 ^a	0 ^{bc}	3.30 ± 0.14 ^d	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a											
TBX	3.69 ± 0.12 ^{defg}	3.60 ± 0.01 ^{defg}	3.82 ± 0.01 ^{defg}	4.17 ± 0.07 ^{ghij}	3.24 ± 0.18 ^{cde}	3.97 ± 0.02 ^{efghi}	4.58 ± 0.28 ^{hij}	4.27 ± 0.05 ^{ghij}											
XLD	0 ^{ab}	2.78 ± 0.25 ^{bcd}	2.45 ± 0.21 ^{bcd}	0 ^a	0 ^a	2.24 ± 0.34 ^{bcd}	0 ^a	0 ^a											
MRSA	4.48 ± 0.03 ^{cdefg}	3.94 ± 0.03 ^{bc}	4.44 ± 0.01 ^{cdefg}	4.42 ± 0.06 ^{cdef}	3.41 ± 0.07 ^b	4.78 ± 0.13 ^{defg}	4.08 ± 0.15 ^{bcd}	3.48 ± 0.02 ^b											

Culture media	Product surface (CFU/ml)*										
	ES1	ES2	ES-CS	MGR1	MGR2	MGR-CS	MNT1	MNT2	CL1	CL2	
TSA	6.10 ± 0.05 ^{de}	6.00 ± 0.74 ^d	7.00 ± 0.21 ^{gh}	6.17 ± 0.12 ^{de}	6.00 ± 0.14 ^d	7.56 ± 0.09 ^f	5.04 ± 0.08 ^{bc}	4.86 ± 0.03 ^b	6.31 ± 0.05 ^{de}	7.57 ± 0.00 ^f	
KA	6.04 ± 0.01 ^e	5.78 ± 0.06 ^d	6.74 ± 0.07 ^h	6.25 ± 0.10 ^g	6.43 ± 0.07 ^g	7.56 ± 0.04 ^f	5.11 ± 0.02 ^c	4.84 ± 0.03 ^b	6.33 ± 0.10 ^{fg}	7.45 ± 0.02 ^{jl}	
BPA	4.29 ± 0.02 ^e	3.72 ± 0.18 ^{bc}	4.80 ± 0.03 ^f	5.29 ± 0.02 ^{hi}	5.27 ± 0.02 ^{ghi}	6.42 ± 0.02 ^k	3.99 ± 0.01 ^{cd}	4.00 ± 0.10 ^{cd}	4.18 ± 0.31 ^{de}	5.94 ± 0.13 ^g	
PA	0 ^a	0 ^a	0 ^a	3.02 ± 0.25 ^d	0 ^{ab}	0 ^a	2.39 ± 0.12 ^{cd}	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
TBX	3.94 ± 0.15 ^{defghi}	4.70 ± 0.02 ^{jl}	3.24 ± 0.41 ^{cde}	3.55 ± 0.08 ^{defg}	3.19 ± 0.06 ^{cd}	3.49 ± 0.26 ^{def}	3.83 ± 0.02 ^{defgh}	0 ^b	0 ^a	4.84 ± 0.06 ^f	
XLD	3.48 ± 0.01 ^d	0 ^a	0 ^a	0 ^{abc}	0 ^{abc}	3.35 ± 0.49 ^{cd}	0 ^{abc}	0 ^a	0 ^a	3.65 ± 0.07 ^d	
MRSA	4.83 ± 0.15 ^{defg}	5.07 ± 0.09 ^{efg}	3.96 ± 0.04 ^{bc}	5.09 ± 0.03 ^{efg}	5.24 ± 0.09 ^g	4.63 ± 0.02 ^{cdefg}	5.12 ± 0.04 ^g	4.40 ± 0.14 ^{cdef}	0 ^a	6.18 ± 0.06 ^h	

±SD, standard deviations of three independent experiments. *Each different lower-case letter represents significant differences according to 2-sided Tukey's HSD between strains ($p < 0.05$). CL1 and CL2, multiple transport box samples (before organ transport); CRZ1 and CRZ2, heart surface samples; ES1 and ES2, stomach surface samples; ES-CS, stomach box sample; H1 and H2, liver surface samples; H-CS, liver box sample; R1 and R2, kidney surface samples; MGR1 and MGR2, lean surface samples; MGR-CS, lean box sample; MNT1 and MNT2, lard samples.

(Figure 4A and Supplementary Material S2). Among general virulence features: adherence, secretion system, chemotaxis and motility, invasion, motility and immune evasion were the most abundant (ranging from 32 to 81 determinants), especially in R1 sample followed by AS (Figure 4A and Supplementary Material S2); however, an immunity-evasion determinant was detected in almost every sample and most prevalent in AS. Other virulence factors detected included motility and export apparatus, motility and enhanced binding to erythrocytes, antiphagocytosis, iron and heme acquisition and Type IV secretion system (Figure 4A and Supplementary Material S2).

Further examination of specific virulence features revealed that flagella, polar flagella, flagella (cluster I), Type IV pili, capsule, Type IV pili, Type IV pili biosynthesis, Hcp secretion island-1 encoded type VI secretion system (H-T6SS), alginate biosynthesis and capsule were the most abundant (15–50 determinants) especially in R1 sample followed by AS (Figure 4B and Supplementary Material S2); however, the capsule virulence determinant was detected in almost every sample and most prevalent in AS. Other virulence features ranging from 5–10 determinant detections included alginate regulation, pyoverdine, lateral flagella, Type IV pili twitching motility related proteins, LPS and Imp operon (Figure 4B and Supplementary Material S2).

DISCUSSION

Animals are common reservoirs of several bacteria harbored by their skin, hair/wool, noses, urogenital and oral cavities, and also intestinal tract that could spread from the animals to the environment, and also from slaughterhouse to the food chain (Sobsey et al., 2006). The metaphylactic and prophylactic use (including use for growth promotion, which now has been banned in Europe since 2006) in agriculture and aquaculture has enhanced zoonotic bacteria as a major reservoir of antibiotic resistance (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2015, 2016). During slaughtering, animal hide, equipment, water, utensils and staff have been recognized as major sources of contamination (Bolton et al., 2002). Thus, contamination from the slaughtering and the processing of the carcasses could occur, spreading from one carcass to another, and could constitute a risk food-borne pathogen risk in humans. This is facilitated by the bacteria's adaptability to multiple hosts, virulence mechanisms and high-rate of genetic exchange of antimicrobial resistance (Price et al., 2012; Lavilla Lerma et al., 2014b; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2015; Liu et al., 2016). These resistant bacteria, considered as superbugs, have become a global challenge and could result in pandemic situations with health and socio-economics repercussions (Padungtod et al., 2008; Fair and Tor, 2014; Founou et al., 2016), with food trade being a contributing factor.

In this study, we evaluated bacterial contamination levels in a porcine slaughterhouse throughout its production chain using culture-dependent and metagenomic methods. In terms of cultures, high loads of mesophilic bacteria (including

pseudomonads, staphylococci, *E. coli* and LAB) were detected in all unit processes on both animal (and products) and process surfaces, especially in zones of: “animal arrivals” (MA and MS), stabling and corral showers (CA and CS), anesthesia (AA and AS), “scalding and depilation” (PA and PS), and “scorching and whip” (FA and FS) with viable counts ranging from 3.5–7.71 log₁₀ CFU/ml. Similarly, Di Ciccio et al. (2016) found an average up to 6 log₁₀ CFU/cm² total viable counts in two pig-slaughterhouse plants in Northern Italy, which was equivalent to the counts obtained in some areas in this study (almost 6 log₁₀ CFU/cm²). Furthermore, anesthesia zone (AA and AS) exhibited the highest counts followed by “scorching and whip” zone (FA and FS). However, the “scalding and depilation” process (intermediate zone between “anesthesia” and “scorching and whip”) significantly improved microbial safety by decreasing microbial counts by 1–3 orders of magnitude (log₁₀), in a similar manner described by Gill and Bryant (1993) for *E. coli* following singeing. These results indicate that the major contamination sources involved handling of livestock hide, carcass, and viscera and process contamination as described elsewhere (Avery et al., 2002; Alegre and Buncic, 2004; Nastasijevic et al., 2008). As for animal products following evisceration, such as kidney, heart, stomach, liver, lean and lard (and also their transporting boxes), they exhibited either similar bacterial counts as their previous slaughterhouse zone (Scorching and whip, FA and FS), or even slightly higher counts in the case of pseudomonads, which suggest accumulated contamination from two main sources: the slaughterhouse environment (e.g., animals, equipment, and staff) and the gastro-intestinal tract of the animals. Thus, these microorganisms can cross-contaminate other products by using the same transport boxes.

The pathogens commonly associated with pork include *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., and *Yersinia enterocolitica* (Korsak et al., 1998; Koutsoumanis and Sofos, 2004; Malakauskas et al., 2006; Mataragas et al., 2008). The results in this study demonstrated that *St. aureus*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. were highly recoverable from animal surfaces, surfaces within the slaughterhouse, viscera and meat products. *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. were present on almost all surfaces; however, some products also exhibited the presence of both pathogens such as kidney, lean and lard (*Listeria* sp.); liver, stomach, lean and their transport boxes (e.g., *Salmonella* sp.). Similarly, Sasaki et al. (2013) also detected several pathogens in swine livers collected at an abattoir, such as *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., and *L. monocytogenes*.

The presence of high microbial loads, especially pathogens in animal products destined to human consumption, constitute a challenge and reinforce the importance of controlling zoonotic pathogens in meat and other animal products through a complete and continuous farm-to-fork examination. In this sense, the high viable counts of all microbial groups found in the areas for anesthesia (AA and AS) and “scorching and whip” (FA and FS) indicate the importance of hygienic controls before further processing (evisceration and cutting) to prevent the spread of microorganisms downstream into the end products. Among these hygienic controls, cleaning and disinfection of anesthesia

surface and scorching and whip band used for several animals (almost 200 animals) should be carried out after a determined number of animals (maximum of 10–20 animals) to reduce the cross-contamination and the increase of bacterial load in these surfaces. Cleaning procedures should be done with hot water under pressure, and disinfection protocols should be based on a rotatory use of several biocides not containing quaternary ammonium compounds and thus avoiding the emergence of resistance to the same biocide, for example the use of HLE disinfectant could be a good strategy (Abriouel et al., 2018).

Taking into consideration the results from the culture-dependent methods, further examination of antibiotic resistance genes and virulence determinants were conducted in selected slaughterhouse zones and products. Metagenomic analyses revealed a high diversity and richness of ARGs, up to 55–62 determinants in anesthesia area (AA and AS) and 35–40 in “animal-arrival zone” (MA and MS). However, “scorching and whip” (FA and FS) area exhibited lowered abundance of ARGs (1–6), indicating that the scalding and depilating process (intermediate zone between “anesthesia” and “scorching and whip”), aimed to remove dirt and hair, had a significant effect in decreasing the resistome, as well as the microbiota (1–3 orders of magnitude). Although, an increase in microbial counts occurred in the subsequent “scorching and whip” zone (FA and FS). Thus, resistant bacteria gradually declined after scalding, leading to disappearance of these ARGs within the pan-microbial community, and thus we observed a decrease in ARG richness and diversity in meat and viscera products, and also in the slaughterhouse environment.

The high prevalence of antibiotic-inactivating enzyme genes (involved in the resistance to several antibiotics: mainly aminoglycosides, beta-lactams, lincosamides, macrolides, phenicols, tetracyclines, nucleoside antibiotics and streptogramin) in “animal-arrival zone” (60% in MA and 65% in MS) and anesthesia area (56% in AA and 56% in AS) were represented by the predominance of aminoglycoside (46–51%) and lincosamide (14–19%) resistance genes, which do not reflect the selective pressures exerted by tetracyclines and beta-lactams commonly used in porcine industry. The presence of mobile genes coding for aminoglycoside inactivation enzymes responsible for aminoglycoside resistance [*N*-acetyltransferases (AACs), *O*-nucleotidyltransferases (ANTs), and *O*-phosphotransferases (APHs)] in these zones represent a great challenge because of the spread of these genes to humans via meat products. In this sense, aminoglycosides are ‘critically important antibiotics’ such as amikacin, neomycin and kanamycin used for the treatment of severe systemic infections and also as a second-line antibiotic in combating multidrug-resistant tuberculosis (WHO, 2012); these antibiotics become inactivated by several enzymes encoded by resistomes in this study such as APH(3′)-IIIa and the broad-spectrum bifunctional enzyme AAC(6′)-Ie-APH(2′′)-Ia, which are considered the most abundant aminoglycoside phosphotransferases in clinical settings and slaughterhouses (Tremblay et al., 2012; Woegerbauer et al., 2014). Furthermore, AAC(6′)-I is also the most prevalent and clinically relevant antibiotic inactivating enzyme present in most human Gram-negative pathogens (Ramirez et al., 2013)

and also detected in several slaughterhouse zones in the present study. On the other hand, the kanamycin nucleotidyltransferase Ant(4′)-Ib, which confers resistance to kanamycin, neomycin and other aminoglycoside, was highly detected in slaughterhouse zones; it was also reported in methicillin-resistant *S. aureus* of human and animal origin (Otarigho and Falade, 2018). Regarding lincosamide resistance, lnuA, lnuB, and lnuC (coding for lincomycin resistance), detected in all studied slaughterhouse zones, were also detected in fecal microbiome of swine, farm workers and the surrounding villagers in China (Sun et al., 2017), and also in *S. aureus* isolates from healthy animals and sick populations in China (Liu et al., 2018).

Thus, pleuromutins, polymyxins, aminoglycosides and lincosamides, used to a lesser extent, may have exerted sufficient selective pressures to maintain ARGs. Conversely, tetracyclines and beta-lactams most commonly administered to pigs appeared to have had minimal impact of selecting and maintaining their related resistance genes; only 1–4 tetracycline resistance genes were observed among 35–62 ARGs, such as *tet44*, *tetB*, *tetQ*, and *tetX* found in “animal-arrival zone” (MA and MS) and anesthesia area (AA and AS). Similar results were obtained by Looft et al. (2012) in swine intestinal microbiome of the antibiotic-fed pigs. This apparent paradox may be explained by the fact that several antibiotics were used in animal therapy (7–9 antibiotics per trimester), resulting in a diversification of resistance genes rather than a selective pressure by a single antibiotic. Or, alternatively, resistance to antibiotic pressures is being driven by generic efflux-pump mechanisms, rather than specific resistance genes.

Concerning virulence determinants, shotgun microbiome sequencing of VRGs evaluated their potential risk throughout meat production chain. In this sense, R1 sample obtained after evisceration constituted the main source of virulence determinants, being a conduit of more than 33 specific factors, represented by 19 classes of virulence features mainly adherence, secretion system, chemotaxis and motility, invasion and motility. However, an immunity-evasion (capsule and lipopolysaccharide) determinant was detected in almost every sample analyzed since the beginning of the slaughter process, with highest abundance in AS. Overall, virulence determinants detected in the pig slaughterhouse were related with pathogenic bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *E. coli*, and *L. monocytogenes*.

In this sense, genes coding for flagella (flagella, polar flagella and lateral flagella; cluster I), capsule, Hcp secretion (island 1, T6SS), Type IV pili (island 2), lipopolysaccharide (O-antigen), pyoverdine and streptococcal enzymes (enolase, plasmin receptor/GAPDH) were harbored in slaughterhouse resistomes (environmental and animal surfaces, and also in end products). Type IV pili are the components of the PAPI-1 (pathogenicity island) conjugation machinery of *P. aeruginosa*, which is essential for the horizontal transmission of PAPI-1 (Carter et al., 2010). Furthermore, other island such as Hcp secretion (island 1), which encodes Type VI secretion system T6SS, was also found in slaughterhouse zones and is widely distributed in the human-pathogen *P. aeruginosa* and *Campylobacter jejuni* from poultry slaughterhouse (Ugarte-Ruiz et al., 2013). Specific virulence determinants of human pathogens

(e.g., *P. aeruginosa* and *Streptococcus*, which can also affect animals), such as pyoverdine and streptococcal enzymes (enolase, plasmin receptor/GAPDH) were distributed in slaughterhouse zones.

We, as such, conclude that there are two main sources of contamination in the pig slaughterhouse: the first one is related with microorganisms of the animal hide, and the second one is related with evisceration step. Conversely to ARGs, VRGs were highly detected after evisceration in some products such as kidney, which reflect poor hygienic practices. Thus, this may be considered a threat to food safety and consumer health since bacteria with virulence determinants could cross-contaminate other products by via transporting boxes and processing surfaces. Slaughterhouses and meat processing represent a nexus of the “One Health” (or “One Medicine”) initiative that links human, animal and environmental health; as such control of ARG and VRG spread by adequate disinfection procedures in slaughterhouse becomes necessary to protect the health of human and animals.

CONCLUSION

With high microbial loadings, and the high diversity and richness of ARGs and VRGs, control measures are required to reduce the risk of spread of pathogenic bacteria and their associated ARGs/VRGs in the slaughterhouse and meat products. In the pig slaughterhouse, there were two main sources of contamination:

REFERENCES

- Abriouel, H., Lavilla Lerma, L., Pérez Montoro, B., Alonso, E., Knapp, C. W., Caballero Gómez, N., et al. (2018). Efficacy of “HLE”-a multidrug efflux-pump inhibitor-as a disinfectant against surface bacteria. *Environ. Res.* 165, 133–139. doi: 10.1016/j.envres.2018.04.020
- Ahn, Y. T., Lim, K. L., Ryu, J. C., Kang, D. K., Ham, J. S., Jang, Y. H., et al. (2002). Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 15, 1790–1792. doi: 10.5713/ajas.2002.1790
- Alegre, V., and Buncic, S. (2004). Potential for use of hide-carcass microbial counts relationship as an indicator of process hygiene performance of cattle abattoirs. *Food Prot. Trends* 24, 814–820.
- Antibiotic Resistance from the Farm to the Table. (2014). *The Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <http://www.cdc.gov/foodsafety/from-farm-to-table.html>
- Avery, S., Small, A., Reid, C. A., and Buncic, S. (2002). Pulsed-field gel electrophoresis characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from hides of cattle at slaughter. *J. Food Prot.* 65, 1172–1176.
- Baquero, F., Tedim, A. P., and Coque, T. M. (2013). Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Antimicrob. Resist. Chemother.* 4:15. doi: 10.3389/fmicb.2013.00015
- Bolton, D., Pearce, R., Sheridan, J., Blair, I., McDowell, D., and Harrington, D. (2002). Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *J. Appl. Microbiol.* 92, 893–902.
- Carlet, J. (2012). The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 1:39. doi: 10.1186/2047-2994-1-39
- Carter, M. Q., Chen, J., and Lory, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. *J. Bacteriol.* 192, 3249–3258. doi: 10.1128/JB.00041-10
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweitzer, R. R., and Schweizer, H. P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of

bacterial communities on the surface of the animals, and other related to evisceration. Thus, controlling these areas by adequate disinfection procedures may reduce risks to food safety and consumer health.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HA, NB, CK, and AG drafted the manuscript. HA designed the experiments. HA, NB, GCC, NCG, and BPM analyzed the data. All authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved the final version.

FUNDING

We acknowledge Research Team (Universidad de Jaén, EI_BIO01_2017).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02099/full#supplementary-material>

MATERIALS S1 and S2 | Antibiotic resistance genes (ARGs) and virulence genes (VRGs) in a pig slaughterhouse, respectively.

- a susceptible mutant strain to triclosan selects for nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 428–432.
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10
- Di Ciccio, P., Ossiprandi, M. C., Zanardi, E., Ghidini, S., Belluzzi, G., Vergara, A., et al. (2016). Microbiological contamination in three large-scale pig slaughterhouses in northern Italy. *Ital. J. Food Saf.* 5:6151. doi: 10.4081/ijfs.2016.6151
- Economou, V., and Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect. Drug Resist.* 8, 49–61. doi: 10.2147/IDR.S55778
- Fair, R. J., and Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* 6, 25–64.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] (2015). *Status Report on Antimicrobial Resistance*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] (2016). *The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Founou, L. L., Founou, R. C., and Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Front. Microbiol.* 7:1881.
- Gilbert, P., Allison, D. G., and McBain, A. J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance. *J. Appl. Microbiol.* 92, 98–110. doi: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x
- Gill, C., and Bryant, J. (1993). *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, in pig carcass dehairing equipment. *Food Microbiol.* 10, 337–344. doi: 10.1006/fmic.1993.1039
- Hecker, M. T., Aron, D. C., Patel, N. P., Leymann, M. K., and Donskey, C. J. (2003). Unnecessary use of antimicrobials in hospitalized patients: current patterns of misuse with an emphasis on the antianaerobic spectrum of activity. *Arch. Intern. Med.* 163, 972–978.
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307.

- Koo, O. K., Mertz, A. W., Akins, E. L., Sirsat, S. A., Neal, J. A., Morawicki, R., et al. (2013). Analysis of microbial diversity on deli slicers using polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis technologies. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 111–119. doi: 10.1111/lam.12021
- Korsak, N., Daube, G., Ghafir, Y., Chahed, A., Jolly, S., and Vindevogel, H. (1998). An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *J. Food Protect.* 61, 535–541.
- Koutsoumanis, K., and Sofos, J. (2004). “Microbial Contamination of Carcasses and Cuts,” in *Encyclopedia of Meat Sciences*, eds W. K. Jensen, C. Devine, and M. Dikeman (Amsterdam: Elsevier Academic Press), 727–737. doi: 10.1016/B0-12-464970-X/00070-2
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Casado Muñoz, M. C., Gálvez, A., and Abriouel, H. (2014a). Antibiotic multi-resistance analysis of mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* sp. isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6792–6806. doi: 10.1128/AEM.01998-14
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Knapp, C. W., Correia Galeote, D., Gálvez, A., and Abriouel, H. (2014b). Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PLoS One* 9:114252. doi: 10.1371/journal.pone.0114252
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., and Abriouel, H. (2013). Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 97–106. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.028
- Laxminarayan, R. (2014). Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. *Science* 345, 1299–1301. doi: 10.1126/science.1254163
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierixh, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munchhof, M. P., van Essen-Zadbergen, A., et al. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 873–880. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x
- Liu, B., Sun, H., Pan, Y., Zhai, Y., Cai, T., Yuan, X., et al. (2018). Prevalence, resistance pattern, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy animals and sick populations in Henan Province, China. *Gut Pathog.* 10:31. doi: 10.1186/s13099-018-0254-9
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- Looff, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., et al. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1691–1696. doi: 10.1073/pnas.1120238109
- Luby, E., Ibekwe, A. M., Zilles, J., and Pruden, A. (2016). Molecular methods for assessment of antibiotic resistance in agricultural ecosystems: prospects and challenges. *J. Environ. Qual.* 45, 441–453. doi: 10.2134/jeq2015.07.0367
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Malakauskas, M., Jorgensen, K., Nielsen, E., Ojeniyi, B., and Olsen, J. E. (2006). *Campylobacter*, spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 295–300.
- Mataragas, M., Skandamis, P., and Drosinos, E. (2008). Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 1–12. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.014
- Nastasijevic, I., Mitrovic, R., and Buncic, S. (2008). Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 126–131.
- Noyes, N. R., Weinroth, M. E., Parker, J. K., Dean, C. J., Lakin, S. M., Raymond, R. A., et al. (2017). Enrichment allows identification of diverse, rare elements in metagenomic resistome-virulome sequencing. *Microbiome* 5:142. doi: 10.1186/s40168-017-0361-8
- Otarigho, B., and Falade, M. O. (2018). Analysis of antibiotics resistant genes in different strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioinformatics* 14, 113–122. doi: 10.6026/97320630014113
- Overdeest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., et al. (2011). Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1216–1222. doi: 10.3201/eid1707.110209
- Padungtod, P., Kadohira, M., and Hill, G. (2008). Livestock production and foodborne diseases from food animals in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 873–879.
- Pawlowski, A. C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H. A., McArthur, A. G., and Wright, G. D. (2016). A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nat. Commun.* 7:13803. doi: 10.1038/ncomms13803
- Price, L. B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P. S., et al. (2012). *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio* 3, 1–6. doi: 10.1128/mBio.00305-11
- Ramirez, M. S., Nikolaidis, N., and Tolmashy, M. E. (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6)-Ib paradigm. *Front. Microbiol.* 4:121. doi: 10.3389/fmicb.2013.00121
- Sasaki, Y., Haruna, M., Murakami, M., Hayashida, M., Ito, K., Noda, M., et al. (2013). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Hepatitis E* virus in swine livers collected at an abattoir. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66, 161–164.
- Sobsey, M. D., Khatib, L. A., Hill, V. R., Alocilja, E., Pillai, S. (2006). “Air quality and emissions from livestock and poultry production/waste management systems,” in *Animal Agriculture and the Environment: National Center for Manure and Animal Waste Management White Papers*, eds J. M. Rice, D. F. Caldwell, and F. J. Humenik (USA: ASABE publication), 609–666.
- Sun, J., Huang, T., Chen, C., Cao, T. T., Cheng, K., Liao, X. P., et al. (2017). Comparison of fecal microbial composition and antibiotic resistance genes from swine, farm workers and the surrounding villagers. *Sci. Rep.* 7:4965. doi: 10.1038/s41598-017-04672-y
- Tremblay, C. L., Letellier, A., Quessy, S., Daignault, D., and Archambault, M. (2012). Antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* in abattoir pigs and plasmid colocalization and cotransfer of tet(M) and erm(B) Genes. *J. Food Prot.* 75, 1595–1602. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-047
- Ugarte-Ruiz, M., Gundogdu, O., Wassenaar, T., Ancochea, C., Porrero, M. C., Dorrell, N., et al. (2013). “Identification of Type VI secretion system (T6SS) in Spanish *Campylobacter jejuni*,” in *Poster at 17th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms*, Aberdeen.
- WHO. (2012). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 3rd Revision 2011*. Geneva: World Health Organization.
- Woegerbauer, M., Zeininger, J., Springer, B., Hufnagl, P., Indra, A., Korschneck, I., et al. (2014). Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph(3’)-IIIa and aph(3’)-IIa in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. *J. Med. Microbiol.* 63, 210–217. doi: 10.1099/jmm.0.065789-0
- Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., et al. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3435–3440. doi: 10.1073/pnas.1222743110

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Campos Calero, Caballero Gómez, Benomar, Pérez Montoro, Knapp, Gálvez and Abriouel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTÍCULO 2

Mapeo in silico de comunidades microbianas y respuestas al estrés en un matadero porcino y sus productos a lo largo de la cadena de producción de la carne, y la eficacia del desinfectante HLE.

In silico mapping of microbial communities and stress responses in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain, and the efficacy of HLE disinfectant.



In silico mapping of microbial communities and stress responses in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain, and the efficacy of HLE disinfectant



Guillermo Campos Calero^a, Natacha Caballero Gómez^a, Leyre Lavilla Lerma^a, Nabil Benomar^a, Charles W. Knapp^b, Hikmate Abriouel^{a,*}

^a Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain

^b Centre for Water, Environment, Sustainability & Public Health, Department of Civil and Environmental Engineering, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:

Slaughterhouse
Metagenomics
In-silico analysis
Bacteria
Virome
Stress genes
Disinfectant

ABSTRACT

The use of shotgun metagenomic sequencing to understand ecological-level spread of microbes and their genes has provided new insights for the prevention, surveillance and control of microbial contaminants in the slaughterhouse environment. Here, microbial samples were collected from products and surrounding areas through a porcine slaughter process; shotgun metagenomic DNA-sequencing of these samples revealed a high community diversity within the porcine slaughterhouse and pork products, in zones originating from animal arrival through to the sale zones. Bacteria were more prevalent in the first zones, such as arrival- and anaesthesia-zones, and DNA viruses were prevalent in the scorching-and-whip zone, animal products and sale zone. Data revealed the dominance of *Firmicutes* and *Proteobacteria* phyla followed by *Actinobacteria*, with a clear shift in the relative abundance of lactic acid bacteria (mainly *Lactobacillus* sp.) from early slaughtering steps to *Proteobacteria* and then to viruses suggesting site-specific community compositions occur in the slaughterhouse. *Porcine-type-C oncovirus* was the main virus found in slaughterhouse, which causes malignant diseases in animals and humans. As such, to guarantee food safety in a slaughterhouse, a better decipher of ecology and adaptation strategies of microbes becomes crucial. Analysis of functional genes further revealed high abundance of diverse genes associated with stress, especially in early zones (animal and environmental surfaces of arrival zone with 57,710 and 40,806 genes, respectively); SOS responsive genes represented the most prevalent, possibly associated with genomic changes responsible of biofilm formation, stringent response, heat shock, antimicrobial production and antibiotic response. The presence of several antibiotic resistance genes suggests horizontal gene transfer, thus increasing the likelihood for resistance selection in human pathogens. These findings are of great concern, with the suggestion to focus control measures and establish good disinfection strategies to avoid gene spread and microbial contaminants (bacteria and viruses) from the animal surface into the food chain and environment, which was achieved by applying HLE disinfectant after washing with detergent.

1. Introduction

Slaughterhouses represent major reservoirs of bacteria, fungi, yeasts, viruses, prions and parasites pathogenic to humans and animals (Bahnson et al., 2005; Heredia and García, 2018; Krog, Larsen, & Breum, 2019; Viegas et al., 2016), and special interest has been given to antimicrobial-resistant (AMR) pathogenic bacteria and their genes (Verraes et al., 2013; Voss et al., 2005). Gene mobilization has been accelerated from the decades of selective pressures caused by

antibiotics used as growth promoters, prophylactic and therapy agents and now transcend ecosystems (Davies and Davies, 2010). Among the genes being exchanged include those responsible for cellular defense, stress tolerance, organism survival and persistence (Maisonneuve and Gerdes, 2014; Norman, Hansen, & Sørensen, 2009). Thus, the emergence of new bacterial strains with enhanced resistome and robustness represent a greater threat in food safety and public health (Schmithausen et al., 2018). The higher genetic exchange promotes microbial and functional diversity, which becomes prevalent in food-

* Corresponding author at: Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Edif. B3, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain.

E-mail address: hikmate@ujaen.es (H. Abriouel).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109486>

Received 5 February 2020; Received in revised form 22 June 2020; Accepted 23 June 2020

Available online 29 June 2020

0963-9969/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

processing environments. Unfortunately, the environmental conditions and nutrient availability in a slaughterhouse shape the microbial diversity and thus the metabolic pathways, by which bacteria survive. The detection of their metabolites (primary and secondary) could become used as indicators to ensure food safety.

Metagenomic and bioinformatic tools can provide a greater sense of food safety (Abriouel et al., 2017; Andjelković et al., 2017) providing deeper insights into the defense mechanisms used by bacteria to withstand stress (and increased resistance) in a slaughterhouse. Moreover, better information on microbial diversity and gene flow remains a critical aspect of food processing systems related to food safety and human health. Previous studies have reported the high diversities of resistomes and virulomes in swine farms and faeces (Munk et al., 2018; Noyes et al., 2017; Zhu et al., 2013). Campos Calero et al. (2018) recently reported high microbial loadings, and their associated high diversity and richness of antimicrobial resistance genes (ARGs) and virulence genes (VGs) throughout a pig slaughterhouse in Jaén (Spain) both related to two main sources of contamination: bacterial contamination on animal surfaces and the evisceration process. As such, in this study, we compared metagenomic gene sequences associated with bacterial stress response, biofilm formation, and competitive defense (e.g., as a consequence of pathogen spread) in different process areas, animal surfaces, and meat products throughout a pig slaughterhouse in Jaén (Spain). It remains crucial to understand and determine the occurring species, their relative abundances and their resistance/defense mechanisms with the aim to reduce their spread and the impact on the environment and health. Furthermore, microbiome mapping was also done with the aim to identify potential indicator organisms in each slaughterhouse processing area and/or meat product necessary for surveillance and control of microbial contaminants.

In this sense, good disinfection strategies become crucial to avoid spreading resistance traits. It has been largely reported in the literature that increases in resistance occur upon application of disinfectants containing certain biocides such as quaternary ammonium compounds (e.g. Buffet-Bataillon, Tattevin, Bonnaure-Mallet, & Jolivet-Gougeon, 2012; Hegstad et al., 2010). Here, we compared the previously developed HLE disinfectant (Abriouel et al., 2018), based on natural substances, with the usual disinfection method used in slaughterhouse environment to examine whether the HLE disinfectant eradicates microbes and further inhibits biofilm establishment on different surfaces and thus decrease the dissemination of resistance determinants.

2. Materials and methods

2.1. Samples

The animal/environmental samples used in the present study were collected from a local pig slaughterhouse (Jaén, Spain) representative of those in the region and receives animals from multiple suppliers and geographic locations, described previously by Campos Calero et al. (2018). Selected zones were sampled as follows: “animal arrival” (MA, MS), anesthesia (AA, AS), “scorching and whip” (FA, FS), evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2) and sale (EA, ES). (“x_A” in sample nomenclature denote animal/meat origin; whereas, “x_S” represent surfaces in the slaughterhouse).

2.2. Microbial and functional diversity determination in pig slaughterhouse throughout meat production chain

2.2.1. Total DNA extraction

The animal/environmental samples were used for DNA community extraction employing ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, California, United States) according to the manufacturer's instructions. Total DNA quantification and quality were assessed by a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). DNA samples were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until required.

2.2.2. Bioinformatic analyses

2.2.2.1. Construction of metagenomic libraries.

Construction of the metagenomic libraries was done using the Illumina Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, United States) according to the manufacturer's instructions. The resulting DNA was pooled by equivalent mass. Library sequencing was done on NextSeq 500 platform (2×150 bp read lengths) at Lifesequencing S.L. (Valencia, Spain). Sequencing yield ranged from 27 to 42 millions of paired end reads depending on the sample, with a mean of 36.6 millions. Raw reads were scanned for adaptors and overall quality with Fastqc v0.11.9 (Andrews, 2010). Trimming by quality and length (Q20 in the extremes, minimum length of 50) was performed with the ‘reformat.sh’ program of the BBTools suite (Bushnell B. – sourceforge.net/projects/bbmap/). Lastly, NGLess v0.8 (Coelho LP et al., 2019) was used to remove sequences coming from *Homo sapiens* (hg38), *Sus scrofa* (GCF_000003025.6) and *Bos taurus* (GCF_002263795.1). The resulting reads were assembled using SPAdes program version 3.13.0 (Bankevich et al., 2012) in ‘profiler’ genomic mode. Assembly and annotation were done at Lifesequencing S.L. (Valencia, Spain). The different kmers were evaluated in terms of N50 and L50 using QUASt program version 5.0.0 (Gurevich, Saveliev, Vyahhi, & Tesler, 2013), and K77 was selected for further analyses. K77 contigs were filtered to retain only those longer than 500 nucleotides. As a result, from 1,447 to 371,101 contigs were obtained depending on the sample, with N50 ranging from 579 to 1,471. Raw sequencing reads have been deposited at the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers ERX2604238 to ERX2604249.

2.2.2.2. Microbial identification.

For microbial identification at species level, we used MetaPhlan2 program version 2.7.4 (Truong et al., 2015) that assign reads to microbial clades more accurately using clade-specific marker genes.

2.2.2.3. Gene prediction and functional annotation.

All contigs were used for coding-DNA-sequence (CDS) prediction via Prodigal program version 2.6.3 (Hyatt et al., 2010). The predicted CDS were annotated using EggNOG-mapper program version 2.0.0 (Huerta-Cepas et al., 2017) against several databases: Gene Ontology (GO), Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG), Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) and KEGG BRITe. To identify the genes involved in stress pathways, the annotated sequences were screened for genes encoding for peptides induced during biofilm formation, heat shock, SOS response, stringent response, and production of antimicrobials and antibiotic resistance.

2.3. Effect of HLE versus usual disinfectant on microbial contamination of slaughterhouse surfaces

HLE (an aqueous solution of 3–6% H_2O_2 , 2.2–4.4% lactic acid and 12.5–25 mM EDTA), developed by Abriouel et al. (2018), was used for surface disinfection, in the same way as the “usual” disinfectant (U-Dis) in the slaughterhouse. Disinfection was applied as a spray to expose, for 15 min, 100-cm² surfaces in selected zones with high microbial loads: anesthesia zone “AS”, scalding and depilating zone “PS”, scorching and whip zone “FS” and weighing and classification zone “BS”. Disinfection strategies (HLE or U-Dis) were used under two conditions: without and after washing-treatment with detergent. The washing treatment with detergent consisted of 15 min exposure to alkaline detergent foam, which was followed by water rinse. Microbial loads were determined as described by Campos Calero et al. (2018) using aerobic mesophilic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and pseudomonads. Sterile swabs were used to collect samples (100 cm²) from the selected zones (described above), repeating this operation eight times following the procedure by Campos Calero et al. (2018). The swab samples were then immersed each one in 1 ml of sterile saline solution (0.85%; Scharlab, Barcelona, Spain) and stored at 4 °C for 24 h to release

bacteria from swabs while minimizing their growth. The bacterial communities from each zone were then serially diluted in sterile saline solution and plated in triplicate on the following media: Tryptone Soya Agar “TSA” (Scharlab, Barcelona, Spain) to estimate total aerobic mesophilic bacteria, Baid Parker Agar “BPA” (Scharlab, Barcelona, Spain) for staphylococci, TBX (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for *E. coli*, and King Agar “KA” (Scharlab, Barcelona, Spain) for pseudomonads. Counts were obtained after 48 h of incubation at 37 °C (TSA, BPA and TBX) and after 72 h of incubation at 22 °C (KA). Results were calculated as the mean of three determinations.

2.4. Statistical analysis

Counts were performed in triplicate. Statistical analyses were conducted using Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, US) program to determine means and standard deviations. Statistical evaluation of the effect of disinfectants (HLE or U-Dis) were carried out by analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Centurion XVI software (Statpoint Technology, Warrenton, Virginia, US). The same software was used to perform Shapiro–Wilk and the Levene tests to check data normality and to perform two-sided Tukey’s multiple contrast to determine the pair-wise differences between strains, where level of significance was set at *P*-value of < 0.05.

3. Results

3.1. Microbiome profile

Each process in the porcine slaughterhouse and pork products could be represented by distinct microbial community structures, based on clade-specific markers of MetaPhlan2. Most bacteria were characterised in the animal-arrival (MA and MS) and the anesthesia (AA and AS) zones with relative abundance of 74–97%; and viruses (only DNA virus) were found in the rest of area such as scorching-and-whip (FA and FS), evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2) and sale (EA and ES) zones (Fig. 1A). However, *Archaea* were only detected at very low proportions in the animal-arrival (MA and MS; 0.66%) and anesthesia (AA and AS; 0.26%) zones (Fig. 1A).

In terms of phyla, bacteria were represented mainly by *Firmicutes* ranging from 46 to 55% and 84–91% in the anesthesia (AA and AS) and the animal-arrival (MA and MS) zones, respectively (Fig. 1B); followed by *Proteobacteria* in the anesthesia (AA and AS), scorching and whip (FS) zones and also kidney (R1) product having relative abundances ranging from 16 to 21% (Fig. 1B). The remaining phyla were under-

represented (0.006–7% of relative abundance), including: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Deinococcus-Thermus* and *Tenericutes* (Fig. 1B). However, *Archaea* were only represented by *Euryarchaeota* (0.26–0.66%) in the animal-arrival (MA and MS) and the anesthesia (AA and AS) zones (Fig. 1B).

Genus-level identification further demonstrates greater diversity among the several zones (Supplementary Materials 1). *Lactobacillus* was highly detected in the animal-arrival (MA and MS; 61–62%) and the anesthesia (AA and AS; 22–31%) zones (Supplementary Materials 1); however, their proportions declined throughout the remaining processing zones, ranging from 0.01 to 0.4% (Supplementary Materials 1). Among *Lactobacillus* species, *L. reuteri* (11–27%), *L. amylovorus* (12–23%), *L. johnsonii* (1.6–13%) and *L. ruminis* (0.2–4%) were more frequently detected in the animal-arrival (MA and MS) than the anesthesia (AA and AS) zones (Supplementary Materials 1). Besides *Lactobacillus* spp., *Acinetobacter* spp. and *Aerococcus* spp. (15–17% relative abundance) were also present in the anesthesia zones (AA and AS; Supplementary Materials 1) mainly represented by *Acinetobacter* sp. (15.07%) and *Aerococcus viridans* (16.2%), respectively (Supplementary Materials 1). However, the low proportion of bacteria recovered from the rest of zones corresponded mainly to *Acinetobacter johnsonii* (9.7%), *Brevundimonas diminuta* (3.86%) and *Sphingopyxis* sp. (1.45%) in FS zone; *Pseudomonas* sp. (9.87%), *Pseudomonas fragi* (1.88%) and *Acinetobacter johnsonii* (1.78%) in R1 product; and *Lactobacillus* phage Sha1 (1.86%) in MGR2 product (Supplementary Materials 1).

DNA virus, comprised mainly of *Gammaretrovirus* genus, represented a major group in scorching-and-whip (FA and FS), evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2) and sale (EA and ES) zones (Supplementary Materials 1), with *Porcine type-C oncovirus* being the most abundant species (74–99%) (Supplementary Materials 1).

Regarding the archaea detected in the animal-arrival (MA and MS) and the anesthesia (AA and AS) zones, *Methanobrevibacter* spp. (0.26–0.65%) and *Methanosphaera* spp. (0–0.01%) were present (Supplementary Materials 1), and corresponded mostly to *Methanobrevibacter* sp. and *Methanosphaera stadmanae*, respectively (Supplementary Materials 1).

3.2. Screening and determination of defense-response stress genes

The functional screening of the complete libraries with regards to stress genes, encoding proteins involved in antimicrobial resistance and various defense strategies, was done by metagenome annotation analysis. The results revealed the presence of genes for antibiotic response,

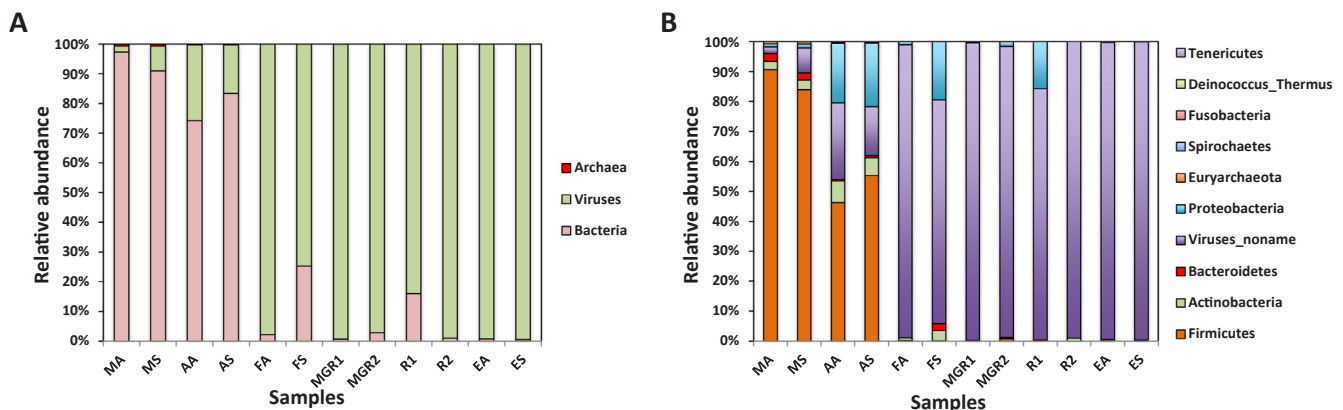


Fig. 1. Taxonomic composition of microbial communities on animal and environmental surfaces of a meat-production chain within a porcine slaughterhouse. Bar plots display the relative abundance of domain (A), phylum (B), genus (C and D) and species (E and F). MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

Table 1
Stress genes detected in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

Sample	Stress genes coding for proteins involved in several responses						
	Antibiotic resistance	Heat shock	Stringent response	SOS response	Biofilm formation	Antimicrobial production	Total genes
MA	409	4.485	12.255	23.345	14.653	2.563	57.710
MS	321	3.276	8.524	16.826	10.162	1.697	40.806
AA	165	1.507	4.194	7.229	4.988	679	18.762
AS	308	2.648	8.403	13.186	9.468	1.420	35.433
FA	0	17	74	72	66	8	237
FS	86	563	3.300	3.405	3.618	459	11.431
MGR1	0	1	7	7	6	1	22
MGR2	6	85	332	352	374	32	1.181
R1	17	122	1.418	695	1.260	111	3.623
R2	0	5	4	11	4	0	24
EA	0	7	18	31	18	1	75
ES	0	1	11	5	15	2	34

MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

heat shock, SOS response, stringent response, biofilm formation and antimicrobial production. The genes involved in defense found in all metagenomes were most prevalent in samples from arrival zone (MA and MS) with 57,710 and 40,806 genes, respectively, followed by anesthesia zone AS (35,433 genes) and AA (18,762 genes) (Table 1). However, samples with lower abundance of genes were animal products, such as MGR1 (22 genes) and R2 (24 genes), and animal and environmental surfaces in the sale zones ES (34 genes) and EA (75 genes) (Table 1). In regards to specific genes involved in several responses, different abundance profiles of functional-gene clusters were detected in order as follows: SOS response > biofilm formation > stringent response > heat shock > antimicrobial production > antibiotic response (Fig. 2A, Table 1). The relationship between gene distribution and sample origin clearly indicated that SOS response genes were highly associated with animal surface in the arrival zone (MA), followed by environmental surface in arrival (MS) and anesthesia (AS) zones (Fig. 2B). Stringent-response genes were mainly represented in MA, MS and AS animal/environmental surfaces (Fig. 2B). Biofilm formation, heat shock and antimicrobial production genes were primarily detected in MA followed by MS and AS (Fig. 2B).

3.2.1. SOS response proteins in animal and environmental surfaces

Analysis of all metagenomes indicated a high prevalence of genes involved in SOS response, encompassing a total of eight groups of encoding genes (Supplementary Materials 2). DNA repair and recombination proteins and homologous recombination proteins were predominant in animal and environmental surfaces in the arrival and anesthesia zones (Table 2). Other gene groups coding for SOS response were those for DNA replication and repair protein RecF, DNA recombination/repair protein RecA, Repressor DNA-binding, DNA-damage-inducible protein D, enoyl-CoA hydratase and protein ImuA (Table 2). However, genes encoding DNA-damage-inducible protein 1 were absent in all metagenomes (Table 2). Furthermore, the abundance of genes coding for SOS response was lower in animal surface than in environmental surface, except in the arrival zone ("MS"; Fig. 3, Table 2). Their abundances declined during meat processing in the slaughterhouse especially in animal products and sale zone, with only DNA repair and recombination proteins, homologous recombination proteins and Repressor DNA-binding being detected (Fig. 3, Table 2).

3.2.2. Stringent response in animal and environmental surfaces

Nine groups of genes encoded for stringent responses (Supplementary Materials 2). Two-component regulatory systems were found in all metagenomes and were most prevalent in animal and environmental surfaces of arrival and anesthesia zones; other genes

included (in decreasing prevalence) beta-galactosidase, RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily, RNA polymerase primary sigma factor and RELA proto-oncogene (Fig. 3, Table 3). However, FMN reductase (NADPH), staphopain B, guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase and stress response kinase A were least abundant and absent in most metagenome samples (Table 3). On the other hand, DNA-directed RNA polymerase subunit D was not detected in any metagenomes (Table 3). Similarly, as for SOS response, the gene abundance declined through the processes, and guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase being absent and in animal products and sale zone (Fig. 3, Table 3).

3.2.3. Heat shock response proteins in animal and environmental surfaces

Fifteen groups of genes encoding for heat shock proteins were found in all metagenomes, including: *rpoH*, *ko03020*, *POL5*, *groES*, *groEL*, *dnaK*, *K04043*, *dnaJ*, *K09526*, *K03283*, *ibpA*, *nnrD*, *clpB*, *hsp70*, *hsp60*, *hrcA*, *grpE*, *ctsR*, *yabO* and *hsp20*, among others (Supplementary Materials 2). Genes coding for RNA polymerase were the most prevalent in animal and environmental surfaces of arrival and anesthesia zones followed by tRNA pseudouridine32 synthase / 23S rRNA pseudouridine746 synthase, molecular chaperone DnaK, ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB, chaperonin GroEL and DnaJ homolog subfamily B member 11 (Table 4). Other genes coding for ADP-dependent NAD(P)H-hydrate dehydratase, HSP20 family protein, molecular chaperone GrpE, heat-inducible transcriptional repressor, Class I heat-shock protein chaperonin GroES, transcriptional regulator of stress and heat shock response, RNA polymerase sigma-32 factor, molecular chaperone IbpA, and heat shock protein family A were less abundant (Fig. 3, Table 4). However, heat-shock 70 kDa protein 1/2/6/8, DnaJ homolog subfamily C member 6 and DNA polymerase phi were not found in any metagenomes (Table 4). As mentioned for other stress responsive genes, animal and environmental surfaces of arrival and anesthesia zones were the most prevalent zones in terms of abundance (Fig. 3, Table 4).

3.2.4. Biofilm formation response in animal and environmental surfaces

Genes coding for biofilm formation were found in all metagenomes, and they were more prevalent on animal and environmental surfaces of the arrival, anesthesia, and scorching and whip zones (Table 5). The detected genes such as *accR*, *acfD*, *acm2*, *acpA*, *acsbg2*, *acsf*, *acta*, *adrA*, *adrB*, *aguD*, *algA*, *amiA*, *amiC*, *amiD*, *aml1*, *ansD*, *ansF*, *anyE*, *appA*, *appB*, *appC*, *appD*, *appF*, *apr*, *araB*, *araD*, *arbF*, among others (Supplementary Materials 2) clustered into four gene groups. These genes (ordered in terms of abundance) encode for quorum sensing, *Escherichia coli* biofilm formation, *Vibrio cholerae* biofilm formation and

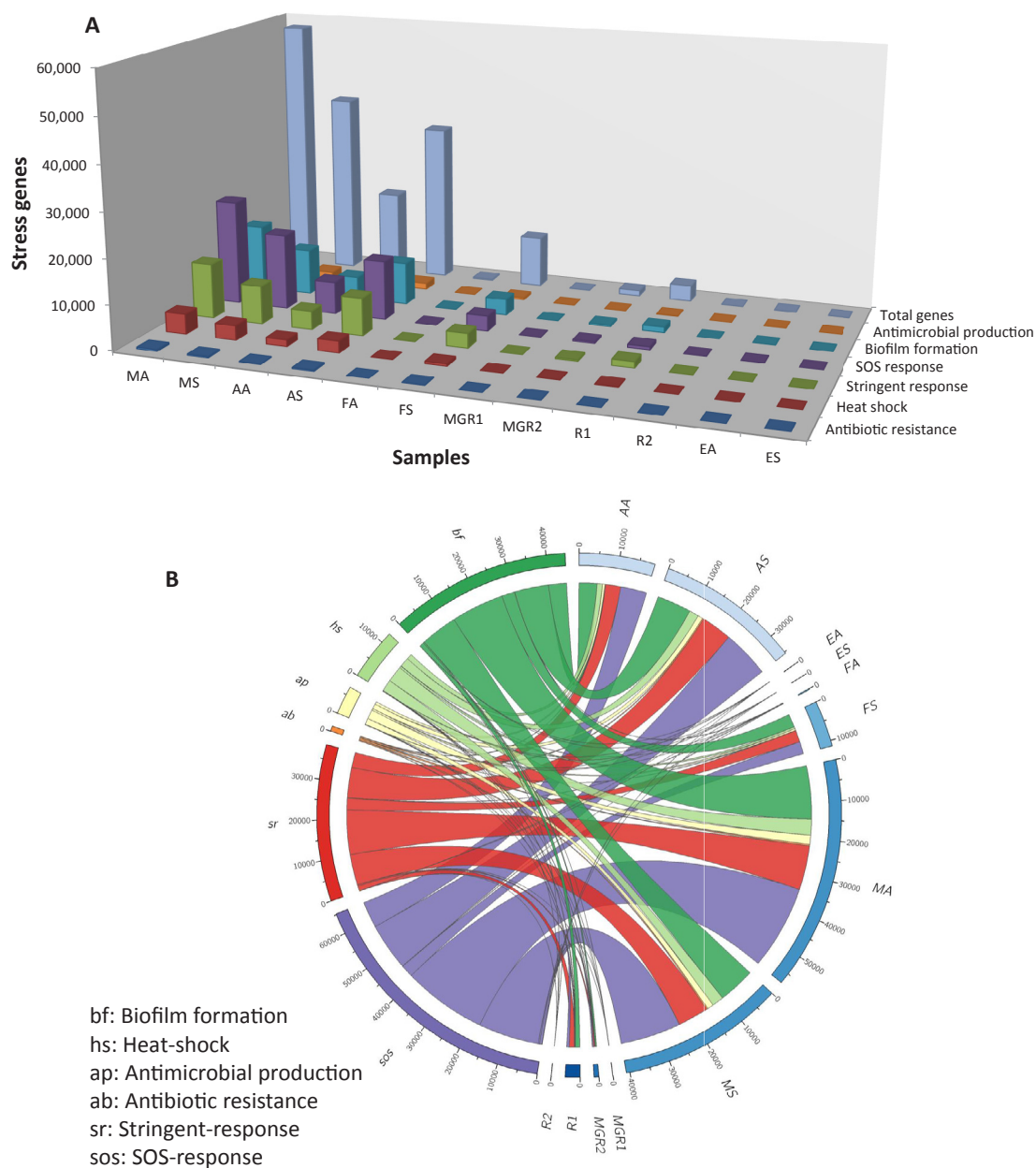


Fig. 2. Distribution and abundance of stress genes detected in metagenomic samples from different slaughterhouse zone/product surfaces [MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone]. **(A)** abundance of stress genes throughout meat chain production. **(B)** Distributions of stress genes and their abundances in metagenomic results from different slaughterhouse zone/product surfaces (visualized via Circos). The length of the bars on the outer-ring represents the abundance of stress genes in each metagenome sample. Each stress gene was represented by a specific ribbon color, and the width of each ribbon demonstrates the abundance of each gene.

Pseudomonas aeruginosa biofilm formation (Fig. 3, Table 5). Furthermore, some animal products showed moderate abundance of genes such as MGR2 and R1; however, the other animal products and sale zone exhibited lower gene abundance (Fig. 3, Table 5).

3.2.5. Antibiotic response proteins in animal and environmental surfaces

A total of six gene groups were found; RNA polymerase nonessential primary-like sigma factors, holin-like protein LrgB, and non-homologous end-joining pathways were the most abundant antibiotic-responsive proteins, followed by protein Veg and *Methylococcus capsulatus* Bath (Fig. 3, Table 6). However, Membrane-associated protein TcaA was less abundant and DNA-directed DNA polymerase IV was absent in all metagenomes (Table 6). Among the detected genes, *rpoS*, *irgB*, *tcaA*,

veg, *mca* and *pol4* were also found (Supplementary Materials 2).

3.2.6. Antimicrobial production response proteins in animal and environmental surfaces

Among the analyzed metagenomes, there were six antimicrobial-production encoding gene groups. Streptomycin biosynthesis was the most abundant (Table 7); other gene groups, ordered in terms of abundance, were as follows: biosynthesis of enediyne antibiotics > cephalosporin-C deacetylase > biosynthesis of vancomycin group antibiotics > penicillin amidase > isopenicillin-N N-acyltransferase like protein (Fig. 3, Table 7). Interestingly, animal products except MGR2 and R1 had all genes, and sale zone exhibited either few or no genes for antimicrobial-production proteins (Fig. 3, Table 7). Among

Table 2

SOS response genes detected in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

SOS response gene group	MA	MS	AA	AS	FA	FS	MGR1	MGR2	R1	R2	EA	ES
DNA-damage-inducible protein D	65	50	3	9	1	3	0	0	0	0	0	0
DNA replication and repair protein RecF	256	203	99	164	1	29	0	5	8	1	0	0
Homologous recombination	7395	5221	2133	3980	24	930	3	105	186	2	6	0
Enoyl-CoA hydratase	8	4	7	13	0	7	0	0	5	0	0	0
DNA repair and recombination proteins	15,174	10,988	4843	8744	46	2366	4	236	467	7	24	4
Repressor DNA-binding	200	151	62	133	0	33	0	1	19	1	1	1
DNA recombination/repair protein RecA	246	209	78	131	0	24	0	5	5	0	0	0
Protein ImuA	1	0	4	12	0	13	0	0	5	0	0	0
DNA-damage-inducible protein I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

the detected encoding genes, *cah* and *ial* were also detected (Supplementary Materials 2).

3.3. Comparing the antimicrobial efficacy of HLE and “usual” disinfectant to decontaminate slaughterhouse surfaces

Environmental surfaces in selected zones (anesthesia zone “AS”, scalding and depilating zone “PS”, scorching and whip zone “FS” and weighing and classification zone “BS”) exhibited high microbial loads of 7–8 log₁₀ CFU/ml, especially in the first zones, and declining to 4–5 log₁₀ CFU/ml at the end of meat processing (Table 8). The application of HLE or “usual disinfectants” in slaughterhouse showed similar results with some enhancement following HLE treatment in some cases with significant statistical differences (Table 8). Regarding pathogens, we saw 2–3 log₁₀-reductions of pseudomonads in the various zones in comparison with control surfaces not treated with disinfectants (Table 8). However, staphylococci were decreased by 1–3 log₁₀-reductions and were undetectable in the weighing and classification zone (Table 8). With respect to *E. coli*, reduction of viable counts was measured by almost 3 log₁₀ units in anesthesia zone, and no viable cells were found in the rest of zones (Table 8). On the other hand, washing with detergent before disinfectant application produced a greatest effect on microbial contamination with HLE application (Table 8). In this

case, no viable cells were observed after HLE-washing with detergent treatment, thus eradicating all staphylococci and *E. coli* in all zones, and also pseudomonads and mesophilic bacteria in weighing and classification zone (Table 8). The impact of HLE-washing with detergent was greater than “usual disinfectant” under similar conditions, which was reflected by the reduction of viable cells (Table 8).

4. Discussion

Understanding the microbial ecology within a slaughterhouse environment remains crucial to provide new insights for the prevention and control of microbial contamination. Metagenomic approaches shed light on the microbial diversity and functional genes that cause serious consequences on food safety and quality; further they can help elucidate gene spread in the environment (Alves et al., 2018; Durso, Harhay, Bono, & Smith, 2011; Singh, Wood, Karouia, & Venkateswaran, 2018). In this study, metagenomic analyses revealed different microbial community structures in several slaughterhouse zones, from animal arrival to sales. Bacteria were more prevalent in the first zones such as arrival or anesthesia zones on both the animal and environmental surfaces. However, the relative abundance of viruses were higher in scorching-and-whip zone, animal products and sale zone.

Dominant bacterial communities in a porcine slaughterhouse on

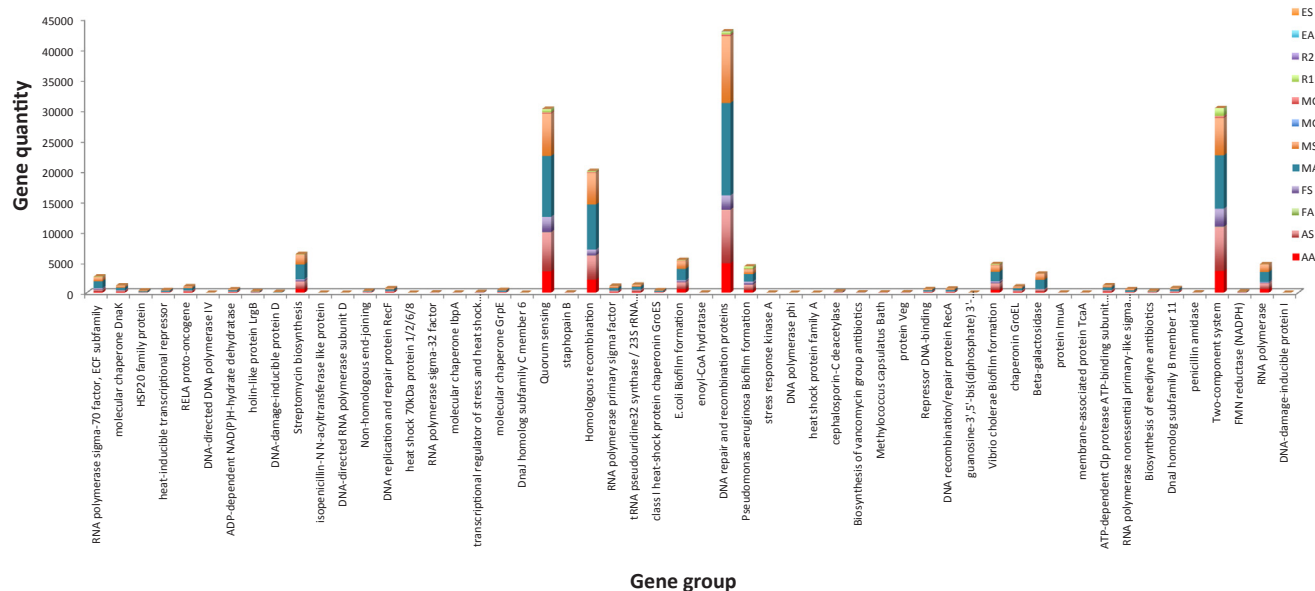


Fig. 3. Distribution and abundance of specific stress genes detected within metagenomic samples of different slaughterhouse zone/product surfaces [MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone].

Table 3
Stringent response genes detected in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

Stringent response gene group	MA	MS	AA	AS	FA	FS	MGR1	MGR2	R1	R2	EA	ES
RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	1113	690	171	334	2	235	0	4	83	0	0	2
RELA proto-oncogene	367	273	131	221	1	27	0	8	11	0	2	0
DNA-directed RNA polymerase subunit D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphopain B	7	4	11	23	0	7	0	1	5	0	0	0
RNA polymerase primary sigma factor	446	337	105	205	1	27	0	8	6	0	2	0
Stress response kinase A	0	0	5	11	0	4	0	0	5	0	0	0
Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beta-galactosidase	1514	1013	163	363	2	51	1	12	16	1	0	0
Two-component system	8752	6154	3575	7200	68	2949	6	299	1288	3	14	9
FMN reductase (NADPH)	54	51	33	46	0	0	0	0	4	0	0	0

MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

both from animal and environmental surfaces highly depend on the area from which samples were taken and are influenced by conditions in the processing plant and the hygienic measures applied. The dominance of *Firmicutes* and *Proteobacteria* phyla followed by *Actinobacteria* aligned with the data by Bridier et al. (2019), which previously reported the dominance of *Proteobacteria* followed by *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* in a pig slaughterhouse environment. Few metagenomic studies have been carried out on slaughterhouse environmental surfaces (Bridier et al., 2019; Campos Calero et al., 2018; Hall et al., 2013); nevertheless most focused on gut microbiomes (Crespo-Piazuelo et al., 2019; Kim and Isaacson, 2015; Quan et al., 2018). We hypothesise that the distribution of microbial populations on environmental surfaces can indicate contamination sources and microbial evolution throughout processing.

During the first slaughtering steps, i.e., animal arrival and anesthesia zones, lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacillus* sp. were the most dominant bacteria, represented by *L. reuteri*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii* and *L. ruminis* followed by *Aerococcus viridans*. These LAB may have originated from many sources, as they are abundant in highly nutritive environments, including decomposing plant material, vegetables and also animal cavities (such as the mouth, genitals, and the intestinal and respiratory tracts); furthermore, their high resistance to environmental conditions promote their survival (Konig and Fröhlich, 2009). However, Gram-negative proteobacteria were represented by *Acinetobacter* sp., *Ac. johnsonii*, *Brevundimonas diminuta*, *Sphingopyxis*

sp., *Pseudomonas* sp. and *P. fragi*, and they were recovered from anesthesia zone, scorching and whip zone, and animal products.

As reported previously by Campos Calero et al. (2018), culture-dependent methods showed high mesophilic loads such as pseudomonads, staphylococci, *E. coli* and LAB in all unit processes on both animal (and products) and process surfaces (MA, MS, FA, FS) with viability counts ranging from 3.5 to 7.71 log₁₀ CFU/ml. However, the metagenomic analysis with total community DNA provides a better measure of the relative abundance of these bacteria in each sampling area than culture-based methods, as many microorganisms are not detected by these methods such as viruses. On the other hand, the results by Bridier et al. (2019) indicated that bacterial communities in the pig slaughterhouse were dominated by the *Moraxellaceae* family, particularly four genera: *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter* and *Enhydrobacter*. As literature lacks metagenomic assessments of microbial diversity and population dynamics in pig slaughterhouse, the data presented here uniquely demonstrates a shift in the relative abundance of LAB in early steps of slaughtering, being superseded by proteobacteria and then viruses suggesting a process-specific composition within the slaughterhouse.

Concerning viruses, the data indicated that porcine endogenous retroviruses (PERVs), which exist in the genome of pigs, were present from the beginning of the porcine slaughterhouse and became most dominant in the scorching-and-whip area until the sale zone, and also animal products. The most prevalent PERVs were represented by *Gammaretroviruse* genus, which was spread from the animals once

Table 4
Heat shock response genes detected in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

Heat shock response gene group	MA	MS	AA	AS	FA	FS	MGR1	MGR2	R1	R2	EA	ES
Molecular chaperone DnaK	417	331	128	225	2	58	1	9	18	0	3	0
HSP20 family protein	176	119	21	39	2	6	0	3	3	0	0	0
Heat-inducible transcriptional repressor	155	107	53	104	0	23	0	2	0	1	0	0
ADP-dependent NAD(P)H-hydrate dehydratase	199	122	82	121	0	25	0	6	10	0	0	0
Heat shock 70 kDa protein 1/2/6/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RNA polymerase sigma-32 factor	6	6	9	23	0	19	0	3	5	0	0	0
Molecular chaperone IbpA	2	0	5	8	2	14	0	0	4	0	0	0
Transcriptional regulator of stress and heat shock response	34	24	26	37	0	0	0	1	0	0	0	0
Molecular chaperone GrpE	166	112	53	96	0	30	0	4	5	0	1	0
DnaJ homolog subfamily C member 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tRNA pseudouridine32 synthase / 23S rRNA pseudouridine746 synthase	479	310	156	300	1	58	0	8	16	1	0	1
Class I heat-shock protein chaperonin GroES	140	114	48	92	0	19	0	1	3	0	0	0
DNA polymerase phi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heat shock protein family A	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chaperonin GroEL	340	268	129	221	0	39	0	7	6	2	2	0
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB	411	315	144	260	1	60	0	8	15	0	0	0
DnaJ homolog subfamily B member 11	280	218	77	165	2	32	0	2	7	1	0	0
RNA polymerase	1678	1229	576	957	7	180	0	31	30	0	1	0

MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

Table 5

Biofilm formation response genes detected in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

Biofilm formation response gene group	MA	MS	AA	AS	FA	FS	MGR1	MGR2	R1	R2	EA	ES
Quorum sensing	9994	6955	3520	6392	37	2499	3	210	555	3	11	10
<i>Escherichia coli</i> Biofilm formation	1890	1321	579	1136	6	296	0	45	123	1	3	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biofilm formation	1210	822	427	891	4	480	1	66	417	0	0	3
<i>Vibrio cholerae</i> Biofilm formation	1559	1064	462	1049	19	343	2	53	165	0	4	0

MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

slaughtered. Retroviral genomes become integrated into the genome of infected germ cells and thus they are detected in organs and tissues, which can be used for xenotransplantation (Acharya, Wallis, Keener, & Gillock, 2019). This genus included mainly *Porcine-type-C oncovirus* species and cause malignant disease in animals and humans as shown *in vitro* by Acharya, Wallis, Keener, & Gillock (2019); similarly, Kim et al. (2016) reported that viral zoonosis occurred under particular host conditions, such as immunosuppressive treatment and transplantation with host-adapted virus-producing cells, and thus transmission of PERV was created from different recipient cells *in vivo*. However, the *in-vivo* studies by Denner (2018) showed that PERV transmission has not been observed in any of the many preclinical and clinical xenotransplantation trials performed so far, and not in any of the many experimental PERV-infection experiments. As such, further consideration of *in-vivo* PERV transmission is required. The presence of porcine viromes in slaughterhouse, including animal and environmental surfaces, represents great relevance not only for clinical safety in xenotransplantation but also in food safety due to viral zoonosis transmission.

We must better decipher the ecology and adaptation strategies of microorganisms to guarantee food safety in a slaughterhouse. Elucidating the diversity and function of genes involved in stress response in animal and surface environments of a porcine slaughterhouse becomes crucial to understand community fate and resilience, and this is best accomplished via metagenomic analysis. The high microbial load in the first slaughterhouse zones such as animal-arrival and anesthesia was directly associated with highly prevalent and diverse repertoire of stress genes, including SOS-response genes being the most abundant. The significance of SOS response in bacterial fitness was largely reported in the context of a complex physiological environment suggesting that SOS response maybe involved in the subsequent stress responses such as antibiotic and other antimicrobial resistance (Samuels et al., 2019). In a slaughterhouse, changing environmental conditions, the density animals and the presence of competing microbes may induce and activate the SOS response; this thus suggests that bacteria become subjected to high levels of stress including DNA damage. Samuels et al. (2019) reported that SOS response played a vital role in colonization of the murine gut; the presence of commensal competing bacteria contributes to stress, and the SOS-response promotes effective

pathogen colonization. Similarly, the first slaughterhouse zones are characterized by a high microbial loads and thus high colonization and high genomic changes as a result of SOS response may occur inducing other potential defense responses.

A network of eight gene groups involved in SOS response consisted mainly of DNA repair and recombination proteins, and homologous recombination proteins, which contribute to bacterial adaptation to external stressors, including antibiotic resistance, (Recacha et al., 2017) and bacterial pathogenesis and virulence (Li et al., 2010; Samuels et al., 2019). Furthermore, other stress responses such as biofilm formation, stringent response, heat shock, antimicrobial production and antibiotic response correlated with SOS response; all had high abundances in the arrival and anesthesia zones. As such, either SOS-response induced subsequent stress responses, or *vice versa*; this is widely reported in the literature as part of the induction process for biofilm formation (e.g., Goneau et al., 2015; Gotoh et al., 2010), which is further mediated by four gene-groups coding for quorum sensing, *Escherichia coli* biofilm formation, *Vibrio cholerae* biofilm formation and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. These gene groupings were found mainly in arrival and anesthesia zones, followed by environmental scorching and whip zone and some animal products (R1 and MGR2).

Furthermore, genomic changes may occur due to the activation of error-prone DNA polymerases and antibiotic-resistance development, which are found in zones of the slaughterhouse. In this sense, there are the propensity of higher mutation rate and acquisition of new genes, which become of great concern since gene spread in food chain and in the environment are responsible of acute, difficult-to-cure infections (Beaber, Hochhut, & Waldor, 2004). SOS response activation can induce horizontal gene transfer; for example Crane, Cheema, Olyer, & Sutton (2018) reported that zinc block of the SOS-response system also inhibited the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in enteric bacteria. Similarly, stringent response may induce the SOS response, or *vice versa*; both responses represent main pathways leading to the generation of persister bacteria and multidrug-resistant bacteria (Lebeaux, Ghigo, & Beloin, 2014; Strugeon, Tilloy, Ploy, & Da Re, 2016). In this respect, among the most abundant antibiotic response genes, the RNA polymerase nonessential primary-like sigma factor has been shown to mediate various cellular responses linked to stress conditions (Gruber and Gross, 2003), followed by holin-like protein LrgB

Table 6

Antibiotic response genes detected in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

Antibiotic response gene group	MA	MS	AA	AS	FA	FS	MGR1	MGR2	R1	R2	EA	ES
DNA-directed DNA polymerase IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Holin-like protein LrgB	94	60	32	50	0	6	0	2	6	0	0	0
Non-homologous end-joining	65	60	33	78	0	66	0	0	8	0	0	0
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	0	2	15	31	0	14	0	0	0	0	0	0
Protein Veg	17	18	21	31	0	0	0	0	0	0	0	0
Membrane-associated protein TcaA	1	1	9	7	0	0	0	0	0	0	0	0
RNA polymerase nonessential primary-like sigma factor	232	180	55	111	0	0	0	4	3	0	0	0

MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

Table 7

Antimicrobial production response genes detected in animal and environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

Antimicrobial production response gene group	MA	MS	AA	AS	FA	FS	MGR1	MGR2	R1	R2	EA	ES
Streptomycin biosynthesis	2425	1594	590	1234	8	373	1	23	75	0	1	2
Isopenicillin-N N-acyltransferase like protein	3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Cephalosporin-C deacetylase	50	32	37	51	0	16	0	3	2	0	0	0
Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	17	7	9	20	0	15	0	1	1	0	0	0
Biosynthesis of enediyne antibiotics	68	64	39	81	0	33	0	5	17	0	0	0
Penicillin amidase	0	0	4	33	0	21	0	0	16	0	0	0

MA, animal surface from arrival zone; MS, environmental surface from arrival zone; AA, animal surface from anesthesia zone; AS, environmental surface from anesthesia; FA, animal surface from scorching and whip zone; FS, environmental surface from scorching and whip zone; samples from evisceration process (kidney R1 and R2; lean MGR1 and MGR2); EA, animal surface from sale zone; ES, environmental surface from sale zone.

and non-homologous end-joining. Moreover, heat-shock induced SOS response and biofilm formation (Roncarati and Scarlato, 2017), thus a complex network regulating stress genes has been established.

Regarding antimicrobial production, genes involved in streptomycin biosynthesis were the most abundant determinants despite the absence of Ab-producing *Streptomyces griseus*, which suggest horizontal gene transfer of these genes to other bacteria in this environment. Also, cephalosporin-, vancomycin- and penicillin-encoding genes were detected in the slaughterhouse zones, which raise great concern since they may represent origins of antibiotic resistance, thus increasing the likelihood

for selection in human pathogens, especially if they are located on genetic mobile elements.

Disinfection represents one of the main strategies to limit and reduce the spread of bacteria, and their associated antimicrobial resistance and defense-mechanism traits. However, the choice of adequate chemicals is crucial to prevent resistance development by several types of bacteria, such as biofilm-formers, and triggering various responses—e.g., increased mutation, increased horizontal gene transmission, production of antibiotic degradative enzymes and over-expression of efflux pumps with broad range of substrate targets (Paraje,

Table 8

Effect of disinfection strategies on microbial counts in environmental surfaces throughout meat chain production in a porcine slaughterhouse.

A. Anesthesia zone (AS)					
Culture media	Microbial counts in environmental surfaces of anesthesia zone (CFU/ml \pm SD*)				
	Control	U-Dis-A	HLE-A	U-Dis-B	HLE-B
TSA	7.7 \pm 0.20 ^c	5.04 \pm 0.08 ^b	5.04 \pm 0.06 ^b	2.9 \pm 0.08 ^a	2.78 \pm 0.00 ^a
KA	8.52 \pm 0.04 ^d	5.72 \pm 0.17 ^c	5 \pm 0.19 ^b	3.3 \pm 0.11 ^a	3 \pm 0.19 ^a
BPA	6.31 \pm 0.08 ^c	4.53 \pm 0.14 ^{bc}	4.12 \pm 0.12 ^b	2.47 \pm 0.12 ^a	0 ^d
TBX	6.06 \pm 0.03 ^d	3.45 \pm 0.05 ^c	2.81 \pm 0.05 ^b	0 ^a	0 ^a
B. Scalding and depilating zone (PS)					
Culture media	Microbial counts in environmental surfaces of Scalding and depilating zone (CFU/ml \pm SD*)				
	Control	U-Dis-A	HLE-A	U-Dis-B	HLE-B
TSA	7.22 \pm 0.02 ^d	3.72 \pm 0.32 ^c	4.28 \pm 0.00 ^b	2.39 \pm 0.12 ^a	2.58 \pm 0.16 ^a
KA	7.58 \pm 0.05 ^d	4.04 \pm 0.08 ^b	4.61 \pm 0.30 ^c	2.75 \pm 0.31 ^b	2 \pm 0.00 ^a
BPA	6.54 \pm 0.10 ^c	3 \pm 0.10 ^b	3.09 \pm 0.07 ^b	0 ^a	0 ^a
TBX	4.40 \pm 0.13 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
C. Scorching and whip zone (FS)					
Culture media	Microbial counts in environmental surfaces of Scorching and whip zone (CFU/ml \pm SD*)				
	Control	U-Dis-A	HLE-A	U-Dis-B	HLE-B
TSA	5.09 \pm 0.12 ^c	3.94 \pm 0.13 ^b	3.96 \pm 0.35 ^b	3.9 \pm 0.02 ^b	3.29 \pm 0.05 ^a
KA	5.88 \pm 0.24 ^b	3.35 \pm 0.01 ^a	3.85 \pm 0.03 ^a	3 \pm 0.31 ^a	3 \pm 0.05 ^a
BPA	4.86 \pm 0.03 ^c	4.72 \pm 0.17 ^c	3.47 \pm 0.21 ^b	2.23 \pm 0.34 ^a	0 ^b
TBX	2.50 \pm 0.28 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
D. Weighing and classification zone (BS)					
Culture media	Microbial counts in environmental surfaces of Weighing and classification zone (CFU/ml \pm SD*)				
	Control	U-Dis-A	HLE-A	U-Dis-B	HLE-B
TSA	4.49 \pm 0.03 ^d	2.60 \pm 0.42 ^b	3.69 \pm 0.00 ^c	0 ^a	0 ^a
KA	4.47 \pm 0.06 ^c	2.74 \pm 0.37 ^b	3 \pm 0.15 ^b	0 ^a	0 ^a
BPA	3.70 \pm 0.04 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
TBX	0	0	0	0	0

SD, standard deviations of three independent experiments.

* Each different lower-case letter represents significant differences according to 2-sided Tukey's HSD between samples ($p < 0.05$).

HLE-A and HLE-B, HLE applied on slaughterhouse surfaces without and after detergent washing, respectively; U-Dis-A and U-Dis-B, usual disinfectant applied on slaughterhouse surfaces without and after detergent washing, respectively.

2011). The efficacy of HLE disinfectant was previously demonstrated by Abriouel et al. (2018) as an alternative way to disinfect surfaces and avoid spread of multi-drug resistant strains in the food chain and the environment since it comprises EDTA, lactic acid and hydrogen peroxide which act synergistically. In this study, the best results were obtained after surface washing with detergent and then the application of HLE to eradicate pathogens such as staphylococci, *E. coli* and pseudomonads in the various slaughterhouse zones with high microbial loads. These results encourage the application of the combined protocol of washing and HLE disinfectant to guarantee food safety and environment protection.

5. Conclusions

The diversity and richness of stress genes were shown especially in the early zones are of great concern and indicate that exhaustive control measures are required to reduce the risk of pathogen spread and their genes throughout slaughterhouse and thus to pork products and environment. Within zones for the arrival of animals and anesthesia, SOS responsive genes were the most prevalent, and could induce genomic changes responsible of biofilm formation, stringent response, heat shock, antimicrobial production and antibiotic response. Throughout meat chain production, the high relative abundance of virome was mainly associated with *porcine-type-C oncovirus*, thus representing another public-health related risk. As such, focused disinfection measures in the first steps in slaughtering based on the application of HLE disinfectant after washing with detergent may allow the reduction of risks to food safety and consumer health by minimising gene spread and microbial contamination from animal surfaces into the food chain and environment.

CRedit authorship contribution statement

Guillermo Campos Calero: Investigation, Methodology. **Natacha Caballero Gómez:** Methodology, Formal analysis. **Leyre Lavilla Lerma:** Methodology, Formal analysis. **Nabil Benomar:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - review & editing. **Charles W. Knapp:** Writing - review & editing. **Hikmate Abriouel:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Supervision, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge Research Structure (Universidad de Jaén, EI_BIO1_2019).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109486>.

References

- Abriouel, H., Pérez-Montoro, B., Casado Muñoz, M. C., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Benomar, N. (2017). *In silico* genomic insights into aspects of food safety and defense mechanisms of a potentially probiotic *Lactobacillus pentostus* MP-10 isolated from brines of naturally fermented Alorea green table olives. *PLoS ONE*, *12*(6), Article e0176801.
- Abriouel, H., Lavilla Lerma, L., Pérez Montoro, B., Alonso, E., Knapp, C. W., Caballero Gómez, N., ... Benomar, N. (2018). Efficacy of "HLE"—A multidrug efflux-pump inhibitor—As a disinfectant against surface bacteria. *Environmental Research*, *165*, 133–139.
- Acharya, R., Wallis, Z. K., Keener, R. J., & Gillock, E. T. (2019). Preliminary PCR-based screening indicates a higher incidence of porcine endogenous retrovirus subtype C (PERV-C) in feral versus domestic swine. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, *122*(3–4), 257–263.
- Alves, L. F., Westmann, C. A., Lovate, G. L., Viana de Siqueira, G. M., Borelli, T. C., & Guazzaroni, M. E. (2018). Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. *International Journal of Genomics*, *2018*, 2312987.
- Andjelković, U., Gajdošik, M. S., Gašo-Sokač, D., Martinović, T., & Josić, D. (2017). Foodomics and food safety: Where we are. *Food Technology and Biotechnology*, *55*(3), 290–307.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Bahnon, P. B., Kim, J. Y., Weigel, R. M., Miller, G. Y., & Troutt, H. F. (2005). Associations between on-farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight pigs. *Journal of Food Protection*, *68*(2), 246–250.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477.
- Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, *427*, 72–74.
- Bridier, A., Le Grandois, P., Moreau, M. H., Prénom, C., Le Roux, A., Feurer, C., & Soumet, C. (2019). Impact of cleaning and disinfection procedures on microbial ecology and *Salmonella* antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse. *Scientific Reports*, *9*, 12947.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2012). Emergence of resistance to antimicrobial agents: The role of quaternary ammonium compounds – a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *39*, 381–389.
- Campos Calero, G., Caballero Gómez, N., Benomar, N., Pérez Montoro, B., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2018). Deciphering resistome and virulome diversity in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2099.
- Crane, J. K., Cheema, M. B., Olyer, M. A., & Sutton, M. D. (2018). Zinc blockade of SOS response inhibits horizontal transfer of antibiotic resistance genes in enteric bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 410.
- Crespo-Piazuelo, D., Migura-García, L., Estellé, J., Criado-Mesas, L., Revilla, M., Castelló, A., ... Folch, J. M. (2019). Association between the pig genome and its gut microbiota composition. *Scientific Reports*, *9*, 8791.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417–433.
- Denner, J. (2018). Why was PERV not transmitted during preclinical and clinical xenotransplantation trials and after inoculation of animals? *Retrovirology*, *15*, 28.
- Durso, L., Harhay, G., Bono, J., & Smith, T. (2011). Virulence-associated and antibiotic resistance genes of microbial populations in cattle feces analyzed using a metagenomic approach. *Journal of Microbiological Methods*, *84*(2), 278–282.
- Goneau, L., Hannan, T. J., MacPhee, R. A., Schwartz, D., MacKlaim, J. M., Gloor, G. B., ... Burton, J. P. (2015). Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *mBio*, *6*, e00356–15.
- Gotoh, H., Kasaraneni, N., Devineni, N., Dallo, S. F., & Weitaio, T. (2010). SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling*, *26*, 603–611.
- Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, *57*, 441–466.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075.
- Hall, R. J., Leblanc-Maridor, M., Wang, J., Ren, X., Moore, N. E., Brooks, C. R., ... McLean, D. J. (2013). Metagenomic detection of viruses in aerosol samples from workers in animal slaughterhouses. *PLoS ONE*, *8*(8), Article e72226.
- Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B. T., Scheie, A. A., Sunde, M., & Yazdankhah, S. P. (2010). Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial Drug Resistance*, *16*, 91–104.
- Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, *4*(3), 250–255.
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Juhl Jensen, L., von Mering, C., & Bork, P. (2017). Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(8), 2115–2122.
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, *11*, 119.
- Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2015). The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary Microbiology*, *177*, 242–251.
- Kim, N., Choi, J., Kim, S., Gwon, Y. D., Cho, Y., Yang, J. M., ... Kim, Y. B. (2016). Transmission of porcine endogenous retrovirus produced from different recipient cells *in vivo*. *PLoS ONE*, *11*(11), Article e0165156.
- König, H., & Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine* (pp. 3–29). Berlin: Springer.
- Krog, J. S., Larsen, L. E., & Breum, S. Ø. (2019). Tracing hepatitis E virus in pigs from birth to slaughter. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 50.
- Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*, 510–543.

- Li, B., Smith, P., Horvath, D. J., Romesberg, F. E., & Justice, S. S. (2010). SOS regulatory elements are essential for UPEC pathogenesis. *Microbes and Infection*, *12*, 662–668.
- Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*, *157*(3), 539–548.
- Munk, P., Knudsen, B. E., Lukjancenko, O., Duarte, A. S. R., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., ... Aarestrup, F. M. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microbiology*, *3*(8), 898–908.
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*, 2275–2289.
- Noyes, N. R., Weinroth, M. E., Parker, J. K., Dean, C. J., Lakin, S. M., Raymond, R. A., ... Morley, P. S. (2017). Enrichment allows identification of diverse, rare elements in metagenomic resistome virulome sequencing. *Microbiome*, *5*, 142.
- Paraje, M. G. (2011). Antimicrobial resistance in biofilms. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances* (pp. 736–744). Badajoz: Formatex.
- Quan, J., Cai, G., Ye, J., Yang, M., Ding, R., Wang, X., ... Wu, Z. (2018). A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios. *Scientific Reports*, *8*, 4536.
- Recacha, E., Machuca, J., Díaz de Alba, P., Ramos-Güelfo, M., Docobo-Perez, F., Rodríguez-Beltran, J., ... Rodríguez-Martínez, J. M. (2017). Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *mBio*, *8*, e00971–17.
- Roncarati, D., & Scarlato, V. (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: From signal sensing to gene expression output. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*, 549–574.
- Samuels, A. N., Roggiani, M., Zhu, J., Goulian, M., & Kohli, R. M. (2019). The SOS response mediates sustained colonization of the mammalian gut. *Infection and Immunity*, *87*(2), e00711–18.
- Schmithausen, R. M., Schulze-Geisthoevel, S. V., Heinemann, C., Bierbaum, G., Exner, M., Petersen, B., & Steinhoff-Wagner, J. (2018). Reservoirs and transmission pathways of resistant indicator bacteria in the biotope pig stable and along the food chain: A review from a one health perspective. *Sustainability*, *10*(11), 3967.
- Truong, D., Franzosa, E., Tickle, T. L., Scholz, M., Weingart, G., Pasolli, E., ... Segata, N. (2015). MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nature Methods*, *12*, 902–903.
- Singh, N. K., Wood, J. M., Karouia, F., & Venkateswaran, K. (2018). Succession and persistence of microbial communities and antimicrobial resistance genes associated with International Space Station environmental surfaces. *Microbiome*, *6*, 204.
- Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M. C., & Da Re, S. (2016). The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *mBio*, *7*(4), e00868-16.
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenue, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., ... Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(7), 2643–2669.
- Viegas, C., Faria, T., dos Santos, M., Carolino, E., Sabino, R., Quintal Gomes, A., & Viegas, S. (2016). Slaughterhouses fungal burden assessment: A contribution for the pursuit of a better assessment strategy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*(3), 297.
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., & Wulf, M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*, *11*, 1965–1966.
- Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., ... Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *110*, 3435–3440.

DISCUSIÓN GENERAL

Los animales son reservorios comunes de varias bacterias asentadas en su piel, pelo/lana, hocicos, cavidades urogenital y oral, y también en el tracto intestinal, que pueden propagarse de los animales al medio ambiente, y también del matadero a la cadena alimentaria (Sobsey et al., 2006). El uso metafiláctico y profiláctico (incluyendo el uso de hormonas de crecimiento, el cual está prohibido en Europa desde 2006) en agricultura y acuicultura ha impulsado el crecimiento de bacterias zoonóticas, siendo estas un importante reservorio de resistencia a antibióticos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2015, 2016).

Durante el sacrificio de los animales, la piel, la materia fecal, el agua, los utensilios y el personal han sido identificados como los principales focos de contaminación (Bolton et al., 2002). Por lo tanto, puede darse la contaminación a partir de las zonas del matadero y del procesado de restos animales, propagándose de una canal a otra, lo que supone un riesgo de transmisión de patógenos a humanos por alimentos contaminados. Esto está favorecido por la adaptabilidad de las bacterias a diferentes hospedadores, sus mecanismos de virulencia y su alta tasa de intercambio genético de resistencia a antimicrobianos (FAO, 2015; Lavilla Lerma et al., 2014b; Liu et al., 2016; Price et al., 2012). Estas bacterias resistentes, consideradas multirresistentes, se han convertido en un reto global, y podrían desembocar en situaciones de pandemia, con repercusiones socioeconómicas y de salud pública (Fair & Tor, 2014; Founou et al., 2016; Padungtod et al., 2008), siendo el comercio de alimentos un factor contribuyente a la propagación de la misma.

En este estudio, hemos evaluado los niveles de contaminación bacteriana en un matadero porcino a lo largo de su cadena de producción, utilizando métodos dependientes y no dependientes de cultivo. Los cultivos mostraron altas cargas de bacterias mesófilas (incluyendo pseudomonas, estafilococos, *E. coli* y BAL) en todas las fases de procesado, en superficies animales y productos generados, especialmente en las zonas de recepción animal (muestras de la superficie del animal "MA" y de la superficie de la zona del matadero "MS"), corrales y zonas de duchado de los animales (CA y CS), en la zona de aturcido por anestesia (AA y AS), en la fase de escaldado y depilado (PA y PS), y en la de chamuscado y

flagelado (FA y FS), con recuentos de células viables de 3.5–7.71 log₁₀ CFU/ml. De igual modo, Di Ciccio et al. (2016) observaron una media de recuentos de viables totales de hasta 6 log₁₀ CFU/cm² en dos mataderos porcinos en el norte de Italia, lo cual coincide con los recuentos obtenidos en algunas áreas en el presente estudio (casi 6 log₁₀ CFU/cm²). Además, la zona de anestesia (AA y AS) mostró los recuentos más altos, seguida de la zona de chamuscado y flagelado (FA y FS). Por otro lado, la zona de escaldado y depilado (zona intermedia entre las zonas de anestesia y chamuscado y flagelado) mejoraron significativamente su seguridad microbiana con un descenso de recuentos microbianos de 1–3 órdenes de magnitud (log₁₀), coincidiendo con los resultados obtenidos por Gill & Bryant (1993) para *E. coli* después del chamuscado. Estos resultados indican que los principales focos de contaminación incluían el manejo de pieles de ganado, restos animales y vísceras, además de la contaminación de procesos, como ya se ha descrito en estudios previos (Avery et al., 2002; Alegre & Buncic, 2004; Nastasijevic et al., 2008). En cuanto a los productos animales obtenidos después de la evisceración (riñón, corazón, estómago, hígado, magro y manteca, así como sus correspondientes cajas de transporte), éstos mostraron recuentos similares a los de las zonas previas (chamuscado y flagelado, FA y FS), o recuentos ligeramente más altos en el caso de pseudomonas, que indican una contaminación acumulada de dos focos principales: el ambiente del matadero (e.g., animales, material y empleados) y el tracto gastrointestinal de los animales. Así pues, estos microorganismos pueden contaminar de forma cruzada otros productos si se transportan en la misma caja, esto revela la importancia que adquiere el correcto uso de envases y el evitar la contaminación cruzada en todas las fases de producción.

Los patógenos comúnmente asociados al cerdo incluyen *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., y *Yersinia enterocolitica* (Korsak et al., 1998; Koutsoumanis & Sofos, 2004; Malakauskas et al., 2006; Mataragas et al., 2008). Los resultados del presente estudio mostraron una alta presencia de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, y *Salmonella* spp. en las superficies animales y ambientales del matadero y en las vísceras y productos cárnicos. *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.

estuvieron presentes en casi todas las superficies, además algunos productos también mostraron la presencia de uno o ambos patógenos, como los riñones y los recortes de carne (magro) (*Listeria* sp., y *Salmonella* ssp.), la manteca (*Listeria* sp.) y los hígados, estómagos y sus respectivas cajas de transporte (e.g., *Salmonella* sp.). Sasaki et al. (2013) también detectaron varios patógenos en hígados de cerdos obtenidos en un matadero, tales como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., y *L. monocytogenes*.

La presencia de altas cargas microbianas, especialmente de patógenos en productos animales para consumo humano, supone un reto y refuerza la importancia del control de patógenos zoonóticos en carnes y otros productos animales a través de una evaluación completa y continua desde la granja hasta la mesa. En este sentido, los altos recuentos viables de todos los grupos de microbios detectados en las zonas de anestesia (AA y AS) y chamuscado y flagelado (FA y FS) muestran la importancia de los controles de higiene previos a la carga de animales para llevarlos al matadero y también indican que puede ser interesante implantar controles de higiene intermedios entre la zona sucia y zona limpia del matadero y antes de continuar con el proceso (destripamiento y despiece), para prevenir la propagación de microorganismos a los productos finales. Entre estos controles de higiene, la limpieza y desinfección intermedia de las zonas de anestesia (butina de CO₂) y chamuscado y flagelado utilizados para una gran cantidad de animales, debería realizarse después de un determinado número de animales (un máximo de 10–20 animales) para reducir la contaminación cruzada y el aumento de la carga bacteriana en estas superficies. Los procedimientos de limpieza deberían realizarse con agua caliente a presión, y los protocolos de desinfección deberían estar basados en un uso rotatorio de biocidas sin compuestos de amonio cuaternario, evitando así la aparición de resistencia al mismo biocida.

Considerando los resultados de los métodos dependientes de cultivo, se realizó un análisis más detallado de los genes de resistencia a antibióticos (GRA) y determinantes de virulencia en zonas seleccionadas del matadero y sus productos mediante métodos moleculares independientes de cultivo.

Los análisis metagenómicos revelaron una alta diversidad y riqueza de ARGs (genes de resistencia a antibióticos), con 55–62 determinantes en la zona de anestesia (AA y AS) y 35–40 en la zona de recepción de animales (MA y MS). Por el contrario, la zona de chamuscado y flagelado (FA y FS) mostró menor abundancia de ARGs (1–6), indicando que el proceso de escaldado y depilado (zona intermedia entre las zonas de anestesia y chamuscado y flagelado), para eliminar suciedad y pelo, tuvo un efecto significativo en la reducción de resistoma, así como de microbiota (1–3 órdenes de magnitud). Sin embargo, se observó un aumento en los recuentos microbianos en la siguiente zona de chamuscado y flagelado (FA y FS). Por tanto, la presencia de bacterias resistentes se reduce gradualmente después del escaldado, lo que lleva a la desaparición de estos ARGs dentro de la comunidad panmicrobiana, lo que explica la reducción de abundancia y diversidad de ARGs en los productos de carne y vísceras, así como en el ambiente del matadero.

La alta prevalencia de genes de enzimas inactivadoras de antibióticos (involucrados en la resistencia a varios antibióticos, principalmente aminoglucósidos, betalactámicos, lincosamidas, macrólidos, fenicoles, tetraciclinas, antibióticos nucleósidos y estreptomycin) en las zonas de recepción de animales (60% en MA y 65% en MS) y anestesia (56% en AA y 56% en AS) mostraron predominancia de genes de resistencia a aminoglucósidos (46–51%) y lincosamida (14–19%), los cuales no reflejan las presiones selectivas ejercidas por tetraciclinas y betalactámicos, comúnmente utilizados en la industria porcina. La presencia de genes móviles codificantes de enzimas inactivadoras de aminoglucósidos, responsables de la resistencia a aminoglucósidos [*N*-acetiltransferasas (AACs), *O*-nucleotidiltransferasas (ANTs), y *O*-fosfotransferasas (APHs)], en estas zonas representa un gran reto debido a la propagación de estos genes a humanos a través de productos cárnicos. En este sentido, los aminoglucósidos son ‘antibióticos de vital importancia’, e.g., amikacina, neomicina y kanamicina, utilizados para el tratamiento de infecciones sistémicas importantes y también como antibiótico de segunda línea para combatir la tuberculosis multirresistente (WHO, 2012); estos antibióticos son inactivados por varias enzimas codificadas por genes detectados en este

estudio, como por ejemplo la APH(3')-IIIa y la enzima bifuncional de amplio espectro AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, consideradas las aminoglucósido-fosfotransferasas más abundantes en ambientes clínicos y en mataderos (Tremblay et al., 2012; Woegerbauer et al., 2014). Además, AAC(6')-I es también la enzima inactivadora de antibióticos más prevalente y clínicamente relevante presente en la mayoría de los patógenos humanos Gram-negativos (Ramirez et al., 2013), y también se detectó en varias zonas del matadero en el presente estudio. Por otro lado, la kanamicina nucleotidiltransferasa Ant(4')-Ib, que confiere resistencia a kanamicina, neomicina y otros aminoglucósidos, mostró gran abundancia en zonas del matadero, y también ha sido encontrada en *S. aureus* resistentes a meticilina de origen humano y animal (Otarigho & Falade, 2018). En cuanto a la resistencia a lincosamida, los genes *inuA*, *inuB* y *inuC* (codificantes de resistencia a lincomicina), detectados en todas las zonas del matadero estudiadas, han sido también identificados en microbioma fecal de cerdos, trabajadores de granjas y aldeanos de los alrededores en China (Sun et al., 2017), así como en aislados de *S. aureus* de animales sanos y poblaciones enfermas en China (Liu et al., 2018).

Por tanto, pleuromutilinas, polimixinas, aminoglucósidos y lincosamidas, utilizados en menor medida, pueden haber ejercido suficiente presión selectiva para mantener los ARGs. En cambio, las tetraciclinas y los betalactámicos, comúnmente administrados a cerdos, parecen haber tenido un impacto mínimo en la selección y mantenimiento de los genes correspondientes a su resistencia; de entre 35-62 ARGs, sólo se detectaron 1-4 genes de resistencia a tetraciclinas en las zonas de recepción animal (MA y MS) y anestesia (AA y AS): *tet44*, *tetB*, *tetQ* y *tetX*. Resultados similares han sido observados por Looft et al. (2012) en microbioma intestinal de cerdos que recibieron administración de antibióticos. Esta aparente paradoja podría deberse a que se utilizaron varios antibióticos en la terapia animal (7-9 antibióticos por trimestre), provocando una diversificación de genes de resistencia en lugar de presión selectiva por un único antibiótico. Otra alternativa es que la resistencia a presiones antibióticas esté determinada por mecanismos genéricos de bombas de eflujo, más que por genes de resistencia específicos.

En cuanto a los determinantes de virulencia, la secuenciación masiva de microbioma evaluó el riesgo potencial de los genes de virulencia (VRGs) a lo largo de la cadena de producción cárnica. En este sentido, la muestra R1 tomada después del destripamiento mostró ser el foco principal de determinantes de virulencia, siendo una vía de más de 33 factores específicos, representados por 19 tipos de rasgos de virulencia, mayormente adherencia, sistema de secreción, quimiotaxis y motilidad, e invasión y motilidad. Sin embargo, se detectó un determinante de evasión de inmunidad (cápsula y lipopolisacáridos) en casi todas las muestras analizadas, desde la primera fase de matanza, con mayor abundancia en AS. En general, los determinantes de virulencia detectados en el matadero porcino estaban relacionados con bacterias como *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *E. coli*, y *L. monocytogenes*.

En este sentido, los resistomas del matadero (superficies animales y ambientales, así como productos finales) albergaban genes codificantes de flagelos (flagelos, flagelos polares y flagelos laterales; grupo I), cápsula, secreción de Hcp (isla 1, T6SS), pili de tipo IV (isla 2), lipopolisacáridos (antígeno O), pioverdina y enzimas estreptocócicas (enolasa, receptor de plasminasa/GAPDH). Los pili de tipo IV son componentes de la maquinaria de conjugación de PAPI-1 (isla de patogenicidad) de *P. aeruginosa*, esencial para la transmisión horizontal de PAPI1 (Carter et al., 2010). Además, otras islas como la de secreción de Hcp (isla 1), la cual codifica para el sistema de secreción T6SS de tipo IV, fue también encontradas en zonas del matadero y están ampliamente distribuidas en el patógeno humano *P. aeruginosa* y en *Campylobacter jejuni* desde mataderos de aves (Ugarte-Ruiz et al., 2013).

Por tanto, concluimos que existen dos focos principales de contaminación en el matadero porcino: el primer foco está relacionado con microorganismos de la piel de los animales, y el segundo foco está relacionado con el proceso de destripamiento. Al contrario que en el caso de los ARGs, los VRGs mostraron alta abundancia después del proceso de destripamiento en algunos productos, como el riñón, que reveló la aplicación de medidas de higiene insuficientes. Así pues, esto puede considerarse una amenaza a la seguridad alimentaria y a la salud del consumidor, ya que las bacterias con determinantes de virulencia

pueden contaminar de manera cruzada otros productos a través de las cajas de transporte y las superficies de procesado. Los mataderos y el procesado de carne representan un nexo de la iniciativa “One Health” (‘una sola salud’) ó “One Medicine” (‘una sola medicina’) que vincula la salud humana, animal y medioambiental; de esta manera, el control de la propagación de ARGs y VRGs con procedimientos de desinfección adecuados en mataderos resulta necesario para proteger la salud de humanos y animales.

Una vez que se demostró la alta presencia de ARGs y de VRGs , nos pareció lógico profundizar en el estudio de la ecología microbiana en el matadero y estudiar la posible presencia de genes funcionales asociados al estrés. Comprender la ecología microbiana presente en el ambiente de los mataderos sigue siendo crucial para ofrecer nuevas perspectivas para la prevención y control de contaminación microbiana. Los enfoques metagenómicos arrojan luz sobre la diversidad de genes con gran impacto en la seguridad y calidad alimentaria; además, pueden ayudar a elucidar la propagación génica en el medioambiente (Alves et al., 2018; Durso, Harhay, Bono, & Smith, 2011; Singh, Wood, Karouia, & Venkateswaran, 2018). En otro estudio, los análisis metagenómicos revelaron diferentes estructuras de comunidades microbianas en varias zonas del matadero estudiado, desde la zona de recepción de animales a la zona de ventas. Las bacterias mostraron mayor prevalencia en las primeras zonas (recepción y anestesia) tanto en superficies animales como ambientales. Sin embargo, la abundancia relativa de virus fue mayor en las zonas de chamuscado y flagelado, zona de ventas y en los productos animales.

Las comunidades de bacterias dominantes en un matadero porcino en superficies animales y medioambientales dependen en gran medida de la zona de la que se toman las muestras, y están influenciadas por las condiciones de la planta de procesado y las medidas de higiene aplicadas. La predominancia de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria*, seguidos de *Actinobacteria*, están en línea con los datos publicados por Bridier et al. (2019), quienes ya reportaron la

predominancia de *Proteobacteria*, seguido de *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* en el ambiente de un matadero porcino. Se han llevado a cabo pocos estudios metagenómicos en superficies ambientales de mataderos (Bridier et al., 2019; Campos Calero et al., 2018; Hall et al., 2013), aunque la mayoría de éstos se centraron en los microbiomas intestinales (Crespo-Piazuelo et al., 2019; Kim and Isaacson, 2015; Quan et al., 2018). Planteamos la hipótesis de que la distribución de poblaciones microbianas en superficies ambientales puede indicar fuentes de contaminación y evolución microbiana a lo largo de la cadena de procesado.

En las primeras zonas del matadero, como son, recepción de animales y anestesia, las bacterias ácido lácticas (BAL), como *Lactobacillus* sp., fueron las más abundantes, representadas por *L. reuteri*, *L. amylovorus*, *L. johnsonii* y *L. ruminis*, seguidas de *Aerococcus viridans*. Estas BAL pueden haberse originado en muchos focos, ya que son abundantes en ambientes altamente nutritivos, incluyendo material vegetal en descomposición, vegetales y cavidades de animales (e.g., boca, genitales y los tractos intestinal y respiratorio); además, su alta resistencia a condiciones ambientales favorece su supervivencia (Konig & Fröhlich, 2009). Por otra parte, las proteobacterias Gram-negativas estaban representadas por *Acinetobacter* sp., *Ac. johnsonii*, *Brevundimonas diminuta*, *Sphingopyxis* sp., *Pseudomonas* sp. y *P. fragi*, y fueron detectadas en las zonas de anestesia y chamuscado y flagelado y en productos animales. En consonancia con los resultados de Campos Calero et al. (2018), los métodos dependientes de cultivo mostraron altas cargas microbianas de mesófilos tales como pseudomonas, estafilococos, *E. coli* y BAL en todas las unidades de procesamiento del matadero tanto en animales (y sus productos) como en superficies (MA, MS, FA, FS), con un rango de recuento de viables entre 3.5 y 7.71 log₁₀ CFU/ml. Sin embargo, el análisis metagenómico del ADN total de la comunidad microbiana ofrece una medida mejor de la abundancia relativa de estas bacterias en cada área de muestreo en comparación con los métodos basados en cultivo, ya que hay muchos microorganismos que no se pueden

detectar por estos métodos, como por ejemplo los virus. Por otro lado, los resultados de Bridier et al. (2019) indicaron que las comunidades de bacterias en el matadero porcino estaban dominadas por la familia de *Moraxellaceae*, en concreto por cuatro géneros: *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter* y *Enhydrobacter*. Dado que la literatura carece de estudios metagenómicos de diversidad microbiana y dinámica poblacional en mataderos porcinos, los datos de este estudio demuestran, de forma novedosa, un cambio en la abundancia relativa de BAL en los primeros pasos de la matanza, que son suplantadas por proteobacterias y, más tarde, por los virus, lo cual sugiere una composición específica de cada proceso dentro del matadero.

En cuanto a los virus, los datos indican la presencia de retrovirus endógenos porcinos (PERVs), los cuales existen en el genoma del cerdo, desde la primera zona del matadero, llegando a predominar en las zonas de chamuscado y flagelado y ventas, así como en los productos finales. Los PERVs más prevalentes fueron del género *Gammaretroviruse*, el cual se propagó a partir de los animales sacrificados.

Los genomas retrovirales se integran en el genoma de células germinales y, por tanto, son detectados en órganos y tejidos, que pueden utilizarse para xenotransplantes (Acharya, Wallis, Keener, & Gillock, 2019). Este género incluye, principalmente, especies de oncovirus porcino tipo C y provocan enfermedades malignas en animales y humanos, algo que ya ha sido demostrado en estudios *in vitro* por Acharya, Wallis, Keener, & Gillock (2019); del mismo modo, Kim et al. (2016) observaron que la zoonosis vírica ocurrió bajo condiciones particulares del hospedador, tales como tratamiento inmunosupresor y trasplante con células productoras de virus adaptadas al hospedador, dando lugar así a la transmisión de PERV desde diferentes células receptoras *in vivo*. Sin embargo, en los estudios *in vivo* de Denner (2018) no se observó la transmisión de PERV en ninguno de los numerosos ensayos preclínicos y clínicos de xenotrasplante llevados a cabo hasta la fecha, ni tampoco en ninguno de los muchos experimentos de infección de PERV. Por

tanto, es necesario dar mayor consideración a la transmisión de PERV *in vivo*. La presencia de viromas porcinos en mataderos, incluyendo superficies animales y ambientales, es de gran relevancia, no solo para la salud clínica en xenotrasplantes sino también en lo referente a la seguridad alimentaria, debido a la transmisión de zoonosis viral.

Es conveniente que descifremos las estrategias de ecología y adaptación de los microorganismos para garantizar la seguridad alimentaria en los mataderos. Dilucidar la diversidad y función de los genes involucrados en la respuesta al estrés en superficies animales y ambientales resulta crucial para comprender el destino y resiliencia de las comunidades de microorganismos, y la manera más eficiente de conseguirlo es a través del análisis metagenómico. La alta carga microbiana en las primeras zonas del matadero del segundo estudio, es decir, recepción de animales y anestesia, se asoció directamente a un repertorio de genes de respuesta al estrés de gran prevalencia y diversidad, siendo los genes de respuesta SOS los de mayor abundancia. La importancia de la respuesta SOS en el fitness bacteriano ha sido ampliamente observado en el contexto de un ambiente fisiológico complejo, sugiriendo que la respuesta SOS podría estar involucrada en las subsecuentes respuestas al estrés, tales como la resistencia a antibióticos y otros antimicrobianos (Samuels et al., 2019). En los mataderos, los cambios en las condiciones ambientales, la densidad animal y la presencia de microbios competidores pueden inducir y activar la respuesta SOS; esto sugiere que las bacterias están sometidas a altos niveles de estrés, incluyendo el daño de ADN. La presencia de bacterias comensales competidoras contribuye al estrés, y la respuesta SOS favorece la colonización efectiva de patógenos. De igual modo, las primeras zonas del matadero se caracterizan por altas cargas microbianas, lo cual puede dar lugar a una alta colonización y grandes cambios genómicos como resultado de la respuesta SOS, induciendo otras respuestas de defensa potenciales.

Una red de ocho grupos de genes involucrados en la respuesta SOS estaba principalmente compuesta por proteínas de reparación y recombinación de ADN

y proteínas de recombinación homóloga, que contribuyen a la adaptación bacteriana a estresores externos, incluyendo la resistencia antibiótica, (Recacha et al., 2017) y la patogénesis y virulencia bacterianas (Li et al., 2010; Samuels et al., 2019). Además, otras respuestas al estrés como la formación de biopelícula, la respuesta estricta, el choque térmico, producción antimicrobiana y respuesta antibiótica se correlacionaron con la respuesta SOS; todas mostraron altas abundancias en las zonas de recepción y anestesia. De esta manera, o bien la respuesta SOS indujo respuestas posteriores al estrés, o viceversa; esto ha sido ampliamente estudiado como parte del proceso de inducción para la formación de biopelícula (e.g., Goneau et al., 2015; Gotoh et al., 2010), lo cual está también mediado por cuatro grupos de genes codificantes de quorum sensing y de la formación de biopelícula por *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas agrupaciones de genes se encontraron principalmente en las zonas de recepción y anestesia, seguidos de la superficie ambiental de la zona de chamuscado y flagelado y algunos productos finales (R1 y MGR2).

También pueden darse cambios genómicos debido a la activación de ADN polimerasas propensas a errores y el desarrollo de resistencia a antibióticos, los cuales fueron detectados en algunas zonas del matadero. En este sentido, se observa la propensión a una mayor tasa de mutación y la adquisición de nuevos genes, lo cual es muy alarmante, ya que la propagación génica en la cadena alimentaria y en el medioambiente son responsables de infecciones agudas difíciles de curar (Beaber, Hochhut, & Waldor, 2004). La activación de la respuesta SOS puede inducir transferencia génica horizontal; por ejemplo, Crane, Cheema, Olyer, & Sutton (2018) observaron que el bloqueo de zinc del sistema de respuesta SOS también inhibe la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos en bacterias entéricas. De igual modo, la respuesta estricta puede inducir la respuesta SOS y viceversa; ambas respuestas representan vías que conducen a la generación de bacterias persistentes y bacterias multirresistentes (Lebeaux, Ghigo, & Beloin, 2014; Strugeon, Tilloy, Ploy, & Da Re, 2016). A este respecto, entre los genes de respuesta a

antibióticos más abundantes, se ha observado que el factor sigma primario no esencial de ARN polimerasa interviene en varias respuestas celulares ligadas a condiciones de estrés (Gruber & Gross, 2003), seguido de la proteína LrgB similar a la holina y la unión de extremos no homólogos. Además, el choque térmico induce la respuesta SOS y la formación de biopelícula (Roncarati & Scarlato, 2017), por lo que se ha establecido una compleja red de regulación de genes de estrés.

En cuanto a la producción antimicrobiana, los genes involucrados en la biosíntesis de estreptomicina fueron los determinantes más abundantes a pesar de la ausencia de *Streptomyces griseus* productor de antibiótico, lo que indica la transferencia de estos genes a otras bacterias en este ambiente. Además, se detectaron genes codificantes de cefalosporina, vancomicina y penicilina en las zonas del matadero, lo cual es muy alarmante, ya que representan orígenes de resistencia a antibióticos, incrementando así la probabilidad de selección en patógenos humanos, especialmente si se localizan en elementos génicos móviles.

En este contexto, la desinfección supone una de las principales estrategias para limitar y reducir la propagación de bacterias y, de esta manera, la resistencia a antibióticos asociada y los determinantes de mecanismos de defensa. Sin embargo, la elección de productos químicos adecuados es crucial para prevenir el desarrollo de resistencia en varios tipos de bacterias, tales como formadores de biopelícula, y los desencadenantes de varias repuestas, cómo, incremento de la mutación, mayor transmisión génica horizontal, producción de enzimas degradantes de antibióticos y sobre-expresión de bombas de eflujo con amplio rango de sustratos diana (Paraje, 2011).

La eficacia del desinfectante HLE ha sido previamente demostrada por Abriouel et al. (2018) como alternativa para la desinfección de superficies y prevenir la propagación de cepas multirresistentes en la cadena alimentaria y el medioambiente, ya que contiene EDTA, ácido láctico y peróxido de hidrógeno,

que actúan sinérgicamente. En este estudio, los mejores resultados se obtuvieron después de lavar previamente la superficie con detergente y aplicar posteriormente HLE para erradicar patógenos como estafilococos, *E. coli* y pseudomonas en las diferentes zonas del matadero con elevadas cargas microbianas. Estos resultados apoyan la aplicación del protocolo combinado de pre-lavado y desinfectante HLE para garantizar la seguridad alimentaria y la protección del medioambiente.

CONCLUSIONES

1. Presencia de bacterias mesófilas en todas las fases de procesado, en superficies animales, superficies del matadero y productos generados a lo largo de la cadena de producción de la carne en un matadero porcino.
2. Determinación de dos focos principales de contaminación en el matadero, las superficies de los animales y el proceso de evisceración, por lo que controlar las áreas dónde se desarrollan estos procesos con una desinfección adecuada puede reducir considerablemente los riesgos para la seguridad alimentaria.
3. Altas cargas microbianas asociadas a una gran diversidad y abundancia de ARGs y VRGs, lo cual exige tomar medidas de control para reducir el riesgo de propagación de bacterias patógenas y sus correspondientes genes ARGs/VRGs en los mataderos y los productos finales.
4. Los ARGs son más abundantes en las primeras fases del sacrificio (estabulación en corrales, anestesiado) mientras que tenemos mayor presencia de VRGs en una fase intermedia como es la evisceración, lo que provoca una mayor presencia en el producto final con el consiguiente riesgo de contaminaciones cruzadas, por lo que las desinfecciones intermedias (desinfecciones durante la jornada de producción) se antojan esenciales para disminuir el riesgo en seguridad alimentaria.
5. La diversidad y riqueza de los genes de estrés encontrados principalmente en las primeras zonas del matadero son alarmantes, e indican la necesidad de aplicar medidas de control exhaustivas para reducir el riesgo de la propagación de patógenos y sus genes a lo largo del matadero y, por tanto, a productos porcinos y el medioambiente.
6. En las zonas de recepción de animales y anestesia, los genes de respuesta SOS fueron los más prevalentes, y podrían inducir cambios genómicos

responsables de la formación de biopelícula, respuesta estricta, choque térmico, producción antimicrobiana y respuesta a antibióticos.

7. A lo largo de la cadena de producción cárnica, la alta abundancia relativa de viroma estuvo mayormente asociada al oncovirus porcino tipo C, lo cual supone otro riesgo relacionado con la salud pública.

8. Medidas de desinfección focalizadas en los primeros pasos de la matanza basadas en la aplicación del desinfectante HLE después de un tratamiento previo de lavado con detergente podrían reducir riesgos de seguridad alimentaria y salvaguardar la salud del consumidor al minimizar la propagación génica y la contaminación microbiana desde superficies animales a la cadena alimentaria y al medioambiente

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, H., Pérez-Montoro, B., Casado Muñoz, M. C., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Benomar, N. (2017). In silico genomic insights into aspects of food safety and defense mechanisms of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 isolated from brines of naturally fermented Aloreña green table olives. *PLoS ONE*, *12*(6) e0176801.
- Abriouel, H., Lavilla Lerma, L., Pérez Montoro, B., Alonso, E., Knapp, C. W., Caballero Gómez, N., Benomar, N. (2018). Efficacy of “HLE”—A multidrug efflux-pump inhibitor—As a disinfectant against surface bacteria. *Environmental Research*, *165*, 133–139.
- Acharya, R., Wallis, Z. K., Keener, R. J., & Gillock, E. T. (2019). Preliminary PCR-based screening indicates a higher incidence of porcine endogenous retrovirus subtype C (PERV-C) in feral versus domestic swine. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, *122*(3–4), 257–263.
- Adams, M. R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, *68*, (2–3) 171-178.
- Ahn, Y. T., Lim, K. L., Ryu, J. C., Kang, D. K., Ham, J. S., Jang, Y. H., et al. (2002). Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, *15*, 1790–1792. [Doi: 10.5713/ajas.2002.1790](https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1790).
- Ammor, M.S. & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science*, *76*, 138-146.
- Alanis, A.J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotics era?. *Archives of Medicine Research*, *36* (6). 697-705 Doi: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>.

- Alegre, V., & Buncic, S. (2004). Potential for use of hide-carcass microbial counts relationship as an indicator of process hygiene performance of cattle abattoirs. *Food Proteins Trends* 24, 814–820.
- Alves, L. F., Westmann, C. A., Lovate, G. L., Viana de Siqueira, G. M., Borelli, T. C., & Guazzaroni, M. E. (2018). Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. *International Journal of Genomics*, 2312987.
- Allen, H.K., Levine, U.Y., Looft, T. Bandrick, M. & Casey, T.A. (2013). Treatment promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trend in Microbiology*, 21, 114-119.
- Andjelković, U., Gajdošik, M. S., Gašo-Sokač, D., Martinović, T., & Josić, D. (2017). Foodomics and food safety: Where we are. *Food Technology and Biotechnology*, 55 (3) 290–307.
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data* [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Antibiotic Resistance from the Farm to the Table. (2014). *The Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <http://www.cdc.gov/foodsafety/fromfarm-to-table.html>
- Aslam, B. Wang, W. Arshad M.I., Khurshid, M. Muzammil, S. Rasool, M.H. Nisar, M.A. Alvi, R.F. Aslam, M.A. Qamar, M.U. Salamat M.K.F. & Baloch, Z. (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658
- Avery, S., Small, A., Reid, C. A., and Buncic, S. (2002). Pulsed-field gel electrophoresis characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from hides of cattle at slaughter. *Journal of Food Protection*, 65, 1172–1176.
- Bado, I. Cordeiro, N. García, L. Robino, V. Seija, V & Vignoli. R. Principales Grupos de Antibióticos. *Bact y Vir Med*. [Internet]. 2006; 34(2)631-636. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

- Bahnson, P. B., Kim, J. Y., Weigel, R. M., Miller, G. Y., & Troutt, H. F. (2005). Associations between on-farm and slaughter plant detection of Salmonella in market-weight pigs. *Journal of Food Protection*, *68* (2), 246–250.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19* (5), 455–477.
- Baquero, F., Tedim, A. P., & Coque, T. M. (2013). Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Antimicrobial Resisance Chemotherapy*, *4*:15. [Doi: 10.3389/fmicb.2013.00015](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00015).
- Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, *427*, 72–74.
- Betancor, L. Gadea M.P. & Flores, K., (2008). Genética Bacteriana. En Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). *Temas de Bacteriología y virología médica*. Montevideo, FEFMUR, Oficina del Libro (Pp. 65-90).
- Bhullar, K. Waglechner, N. Pawlowski, A. Koteva, K. Bank, E.D. Johnston, M.D., Barton, H.A. & Wright, G.D. (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE*, *7*(4) e34953.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., & Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of actibiotic resistance. *Nature*, *13*, 42-51.
- Bolton, D., Pearce, R., Sheridan, J., Blair, I., McDowell, D., & Harrington, D. (2002). Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *Jounal Applied Microbiology*, *92*, 893–902.
- Bridier, A., Le Grandois, P., Moreau, M. H., Prénom, C., Le Roux, A., Feurer, C., & Soumet, C. (2019). Impact of cleaning and disinfection procedures on microbial ecology and Salmonella antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse. *Scientific Reports*, *9*, 12947.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2012). Emergence of resistance to antimicrobial agents: The role of

- quaternary ammonium compounds – a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, 381–389.
- Buncic, S, Nychas G.J., Lee M.R.F., Koutsoumanis K., M Hébraud, M. E., Desvaux, M. et al. (2013). Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. *Meat Science*, 97, 288–297
- Buzón Duran, L. (2017). *Resistencia a antibióticos y capacidad para formar biofilm en cepas de MRA (Staphylococcus aureus resistente a la meticilina) y Salmonella de origen alimentario*. Tesis Doctoral. Universidad de León, no publicada
- Campos Calero, G., Caballero Gómez, N., Benomar, N., Pérez Montoro, B., Knapp, C. W., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2018). Deciphering resistome and virulome diversity in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2099.
- Capita González, R. (2013). *Papel de la industria alimentaria en el control de la resistencia bacteriana a los antibióticos*. Discurso de toma de Posesión como Académica Correspondiente. Universidad de León. Documento no publicado
- Capita, R. & Alonso-Calleja, C. (2013) Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 11-48.
- Cárdenas-Perea, M.L., Cruz y López, O.R., Gándara-Ramírez, J.L. y Pérez-Hernández, M.A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94, 35-43
- Carlet, J. (2012). The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance Infections Control* 1:39. Doi: [10.1186/2047-2994-1-39](https://doi.org/10.1186/2047-2994-1-39).
- Carter, M. Q., Chen, J., & Lory, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. *J. Bacteriol.* 192, 3249–3258. Doi: [10.1128/JB.00041-10](https://doi.org/10.1128/JB.00041-10).

- Cattoir, V. (2004). Efflux mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathologie biologie*, 52, 607-616.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweitzer, R. R., & Schweizer, H. P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects for nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45, 428–432.
- CDDEP (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy) (2015). *State of the world's antibiotics* [Internet]. Washington, D.C. Disponible en: http://cddep.org/sites/default/files/swa_2015_final.pdf
- Cepero Briz, R. (2006). *Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: Causas y consecuencias*. Departamento de producción animal y ciencia de los alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza (documento no publicado)
- Cloete, T.E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52 (4) 277-282.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between *gram-positive* and *gram-negative* bacteria. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 38 (7) 1447-1451.
- Crane, J. K., Cheema, M. B., Olyer, M. A., & Sutton, M. D. (2018). Zinc blockade of SOS response inhibits horizontal transfer of antibiotic resistance genes in enteric bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 410.
- Crespo-Piazuelo, D., Migura-Garcia, L., Estellé, J., Criado-Mesas, L., Revilla, M., Castelló, A., Muñoz, M., García-Casco, J.M., Fernández, A.I., Ballester, M., Folch, J. M. (2019). Association between the pig genome and its gut microbiota composition. *Scientific Reports*, 9, 8791. doi: 10.1038/s41598-019-45066-6.

- Da Costa, M., Oliveira, M. Ramos, B & Bernardo, F (2011). The impact of antimicrobial use in broiler chickens on growth performance and on the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Livestock Science*, 136, 262-269.
- Das, A.K. Nanda, P.K., Das, A. and Biswas, S. (2019) Hazards and Safety Issues of Meat and Meat Products. (Eds) *Food Safety and Human Health*..(pp. 145-167)
- DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816333-7.00006-0> 145-267
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (3), 417–433.
- Denner, J. (2018). Why was PERV not transmitted during preclinical and clinical xenotransplantation trials and after inoculation of animals?. *Retrovirology*, 15, 28.
- Devirgiliis, C. Zinno, P & Perozzi, G. (2013). Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 4, 301.
- Diacovich L & Gorvel JP., (2010). Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 117-128.
- Di Ciccio, P., Ossiprandi, M. C., Zanardi, E., Ghidini, S., Belluzzi, G., Vergara, A., et al. (2016). Microbiological contamination in three large-scale pig slaughterhouses in northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 5:6151. [Doi: 10.4081/ijfs.2016.6151](https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.6151).
- Doyle, M.P.& Beuchat, L. (2007). *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. New York, Washington DC. ASM Press.
- Durso, L., Harhay, G., Bono, J., & Smith, T. (2011). Virulence-associated and antibiotic resistance genes of microbial populations in cattle feces analyzed using a metagenomic approach. *Journal of Microbiological Methods*, 84 (2), 278–282.

- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61. Doi: [10.2147/IDR.S55778](https://doi.org/10.2147/IDR.S55778).
- EFSA, (European Food Safety Authority) (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10, 2740.
- EFSA, (European Food Safety Authority), (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, (12):4329.
- Edqvist, L.E. & Pedersen, K.B (2001). Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense. En European Environment Agency (Ed.): *Late Lessons from Early Warnings: The Precautionary Principle 1896-2000*. European Environment Agency, Copenhagen (Pp. 93-100).
- ESVAC (2019). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017*. EMA/294674/2019. Veterinary Medicines Division.
- Evans, D.G., Doyle J. Evans, D.J., Clegg, S. & Pauley, J. A. (1979) Purification and Characterization of the Cfa/I Antigen of Enterotoxigenic Escherichia Coli. *Infection And Immunity*, 25 (2) 738-748. Doi: [0019-9567/79/08-0738/11\\$02.00/0](https://doi.org/10.1093/infdis/25.2.738).
- Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 25–64.
- Chambes P.G., Grandin T., Heinz G., Srisuvan T.(FAO), (2001) Directrices para el Manejo, Transporte y Sacrificio Humanitario del Ganado [Internet] <http://www.fao.org/3/X6909s/x6909s00.htm#Contents>.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). *Status Report on Antimicrobial Resistance*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Fellows, P. (2004). Los alimentos: su elaboración y transformación. In: FAO, Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Ed.), *Folleto de la FAO sobre diversificación 5*, Roma.
- Finlay BB & McFadden G. (2006). Anti-immunology: evasion of the host immunesystem bybacterial and viral pathogens. *Cell 124*, 767-82
- Flannagan RS, Cosío G & Grinstein S. (2009). Antimicrobialmechanisms of phagocytes andbacterialevasionstrategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 355-366.
- Foulquié- Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L.(2006). The role and application of *enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1–24.
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Frontiers Microbiology*, 7:1881.
- Fraqueza, J. M. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., & Holzapfel, W.H. (2003). *Enterococci* in foods: a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* . 88, 105- 122.
- Furuya, E. & Lowy, F.D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4 (1) 36-45.
- Gilbert, P., Allison, D. G., & McBain, A. J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 98–110. Doi: [10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x).
- Gill, C., & Bryant, J. (1993). *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, in pig carcass dehairing equipment. *Food Microbiology*, 10, 337–344. Doi: [10.1006/fmic.1993.1039](https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1039).
- Goneau, L., Hannan, T. J., MacPhee, R. A., Schwartz, D., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., ... Burton, J. P. (2015). Subinhibitory antibiotic therapy alters recurrent

- urinary tract infection pathogenesis through modulation of bacterial virulence and host immunity. *mBio*, *6*, e00356–15.
- González-Pedrajo B y Dreyfus G. (2003) Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje bioquímico XXVII* 45-63.
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>
- Gotoh, H., Kasaraneni, N., Devineni, N., Dallo, S. F., & Weitao, T. (2010). SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling*, *26*, 603–611.
- Gouin E, Gantelet H, Egile C, Lasa I, Ohayon H, Villiers V, Gounon P, Sansonetti, PJ & Cossart P. A. (1999). Comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *Cell Science*, *112*(11) 1697-1708.
- Gruber, T. M., & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, *57*, 441–466.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29* (8), 1072–1075.
- Hall, R. J., Leblanc-Maridor, M., Wang, J., Ren, X., Moore, N. E., Brooks, C. R., ... & McLean, D. J. (2013). Metagenomic detection of viruses in aerosol samples from workers in animal slaughterhouses. *PLoS ONE*, *8*(8), e72226.
- Hecker, M. T., Aron, D. C., Patel, N. P., Leymann, M. K., & Donskey, C. J. (2003). Unnecessary use of antimicrobials in hospitalized patients: current patterns of misuse with an emphasis on the antianaerobic spectrum of activity. *Archives International Medicine*, *163*, 972–978.
- Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B. T., Scheie, A. A., Sunde, M., & Yazdankhah, S. P. (2010). Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial Drug Resistance*, *16*, 91–104.

- Hennekinne, J.A. De Buyser, M.L. & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (4) 815–836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>.
- Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, 4 (3), 250–255.
- Hernández-Rodríguez, M. y Sastre-Gallego, A. (1999). *Tratado de Nutrición*. Madrid: Ed. Diaz Santos.
- Heuvelink, A.E., Roessink, G.L., Bosboom, K., & De Boer, E., (2001). Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. *International Journal Food Microbiology*, 66 (1-2), 13-20.
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Jensen, L.J., von Mering, C., & Bork, P. (2017). Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Molecular Biology and Evolution*, 34 (8), 2115–2122.
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11, 119.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications) (2000). In: *Microorganismos de los alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración*. Zaragoza, Editorial Acribia.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). In: *Modern Food Microbiology. Food Science Text Series*. Springer, New York.

- Kannan, S. Ambujam, S. & Govindasamy, A. (2020). *Listeria monocytogenes*- Amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion. *Microbial Pathogenesis* 149, 104575. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104575>.
- Khameneh, B. Diab, R. Ghazvini, K. & Bazzaz, B.S.F. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*, 95, 32-42.
- Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2015). The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary Microbiology*, 177, 242–251.
- Kim, J.H. & Yim, D.G. (2017). Microbial levels for food contact and environmental surfaces in meat processing plants and retail shops. *Food Sciences Biotechnology*, 26 (1): 299-302. Doi: 10.1007/s10068-017-0040-3.
- Kim, N., Choi, J., Kim, S., Gwon, Y. D., Cho, Y., Yang, J. M., Oh, Y.K. Kim, Y. B. (2016). Transmission of porcine endogenous retrovirus produced from different recipient cells in vivo. *PLoS ONE*, 11 (11), e0165156.
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307.
- Kirbis, A. & Kizman, M. (2015). Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and viceversa. *Procedia Food Science*, 5, 148-151.
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S & Tolker-Nielsen T. (2003) BiofilmformationbyPseudomonasaeruginosa wild type, flagellaand type IV pilimutants. *Molecular Microbiology*, 48, 1511-1524
- Knorr, D. & Augustin, M.A. (2021). Food processing needs, advantages and misconceptions. *Trends in Food Science & Technology* 108, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.026>.
- König, H., & Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In H. König, G. Unden, & J. Fröhlich (Eds.). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine* (pp. 3–29). Berlin: Springer.

- Koo, O. K., Mertz, A. W., Akins, E. L., Sirsat, S. A., Neal, J. A., Morawicki, R., et al. (2013). Analysis of microbial diversity on deli slicers using polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis technologies. *Letf. Applied Microbiology*, 56, 111–119. Doi: [10.1111/lam.12021](https://doi.org/10.1111/lam.12021).
- Kopper ,G. Mirecki S., Kljujev I.S. Raicevic V.B. Lalevic B.T. Jovicic-Petrovic J., Stojanovki S. et Blazekovic-Dimovska D.(2013). Hygiene in Primary Production. *Food Safety Management*, 559-621.
- Korsak, N., Daube, G., Ghafir, Y., Chahed, A., Jolly, S., & Vindevogel, H. (1998). An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *Journal Food Protection*. 61, 535–541.
- Koutsoumanis, K., & Sofos, J. (2004). “Microbial Contamination of Carcasses and Cuts,”. In W. K. Jensen, C. Devine, & M. Dikeman (Eds.). *Encyclopedia of Meat Sciences*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, (Pp.727–737). Doi: [10.1016/B0-12-464970-X/00070-2](https://doi.org/10.1016/B0-12-464970-X/00070-2).
- Krog, J. S., Larsen, L. E., & Breum, S.Ø. (2019). Tracing hepatitis E virus in pigs from birth to slaughter. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 50.
- Kumar, A. & Schweizer, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advances Drug Delivery Review*, 57, 1485-1513.
- Lambris J.D., Ricklin D. & Geisbrecht B.V. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nature Review of Microbiology*, 6, 132-142.
- Lasa, I. del Pozo, J.L., Penadés J.R. & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección (Bacterial biofilms and infection). *An. Sist. Sanit. Navar.* 28 (2): 163-175.
- Latham, M.C. (2002). Nutrición Humana en el mundo en desarrollo. In: FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación) (Ed.), *Colección FAO: Alimentación y Nutrición n° 29*, Roma
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2013). Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant

- surfaces throughout meat chain production. *Internarional Journal Food Microbiology*, 161, 97–106. [Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.028](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.028).
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Casado Muñoz, M. C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014a). Antibiotic multi-resistance analysis of mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* sp. isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Applied Envirommental. Microbiology*, 80, 6792–6806. [Doi: 10.1128/AEM.01998-14](https://doi.org/10.1128/AEM.01998-14).
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Knapp, C. W., Correa Galeote, D., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014b). Diversity, distribution and quantification of antibiotic *monocytogenes*, resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PLoS One*, 9:114252. [Doi: 10.1371/journal.pone.0114252](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114252).
- Laxminarayan, R. (2014). Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. *Science*, 345, 1299–1301. [Doi: 10.1126/science.1254163](https://doi.org/10.1126/science.1254163).
- Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78, 510–543.
- Lekshmi M, Ammini P, Kumar S. & Varela M (2017). The food production environment and the development of antimicrobial resistance in human pathogens of animal origin. *Microorganisms*, 25 (1):11.
- Lester, C.H., Frimodt-Maller, N., Srensen, T.L., Monnet, D.L. & Hammerum, A.M. (2006). In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin too an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2) 596-599.
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierihx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zadbergen, A., et al. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and

- strains. *Clinical Microbial Infection*, 17, 873–880. Doi: [10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x).
- Levy, S.B., (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 65s–71s.
- Levy, S.B. & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, S122-S129.
- Li, B., Smith, P., Horvath, D. J., Romesberg, F. E., & Justice, S. S. (2010). SOS regulatory elements are essential for UPEC pathogenesis. *Microbes and Infection*, 12, 662–668.
- Livermore, D.M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clinical Infectious Disease*, 36, 1-23.
- Liu, B., Sun, H., Pan, Y., Zhai, Y., Cai, T., Yuan, X., et al. (2018). Prevalence, resistance pattern, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy animals and sick populations in Henan Province. China. *Gut Pathog.* 10:31. Doi: [10.1186/s13099-018-0254-9](https://doi.org/10.1186/s13099-018-0254-9).
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infection Dis.* 16, 161–168. Doi: [10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- Lloyd, S.A, Sjöström M, Andersson S & Wolf-Watz, H. (2002). Molecular characterization of the type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Molecular Microbiology*, 43, 51-59
- Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., et al. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1691–1696. Doi: [10.1073/pnas.1120238109](https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109).
- Luby, E., Ibekwe, A. M., Zilles, J., & Pruden, A. (2016). Molecular methods for assessment of antibiotic resistance in agricultural ecosystems: prospects and

- challenges. *Journal Environmental Quality*, 45, 441–453. Doi: [10.2134/jeq2015.07.0367](https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0367).
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology Infection* 18, 268–281. Doi: [10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x).
- Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*, 157(3), 539–548.
- Malakauskas, M., Jorgensen, K., Nielsen, E., Ojeniyi, B., & Olsen, J. E. (2006). *Campylobacter*, spp. from a pig slaughterhouse and analysis of crosscontamination. *International Journal Food Microbiology*, 108, 295–300.
- Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. (2008). Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *International Journal Food Microbiology*, 126, 1–12. Doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.014](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.014).
- McDonnell, G. & Russell, D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 147–179. Doi: [0893-8512/99/\\$04.0010](https://doi.org/10.1128/0893-8512.99.04.0010).
- McEvoy, J. Doherty, A. Finnerty M, Sheridan, J. McGuire, L. Blair I. et al. (2000). The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Lett. Applied Microbiology*, 30 (5) 390-395.
- Meylan E, Tschopp J & Karin M., (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 7098, 39-44.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de España Unión Europea (2005). Reglamento CE 2073/2005 (CE) de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 338/1/ 22.12.2005.

- Munk, P., Knudsen, B. E., Lukjancenko, O., Duarte, A. S. R., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., ...& Aarestrup, F. M. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microbiology*, 3 (8), 898–908.
- Murray PR, Rosenthal KS & Pfaller MA. (2009). Microbiología médica. 6ª ed. Madrid: Ed. Elsevier Mosby .
- Nastasijevic, I., Mitrovic, R., & Buncic, S. (2008). Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Lett. Applied Microbiology*, 46, 126–131.
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2275–2289.
- Nørrung, B. Andersen, J.K. and Buncic, S. (2009). Main Concerns of Pathogenic Microorganisms in Meat. En F. Toldrá (Ed.), *Safety of Meat and Processed Meat, Food Microbiology and Food Safety*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89026-5_1
- Noyes, N. R., Weinroth, M. E., Parker, J. K., Dean, C. J., Lakin, S. M., Raymond, R. A., ...& Morley, P. S. (2017). Enrichment allows identification of diverse, rare elements in metagenomic resistome virulome sequencing. *Microbiome*, 5, 142.
- Obando Pacheco, P., Suárez-Arrabal, M.C. y Esparza Olcina, M.J. (2020). *Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos*. (v.3/2020). Guía_ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea] Disponible en: <https://www.guia-abe.es>.
- Otarigho, B., & Falade, M. O. (2018). Analysis of antibiotics resistant genes in different strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioinformatics* 14, 113–122. Doi: [10.6026/97320630014113](https://doi.org/10.6026/97320630014113).
- Ouali ,A., Herrera-Mendez, H. Coulis, C.G., Becila, S. Boudjellal, A. Aubry, L. et al. (2006) Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74, 44–58.

- Overdevest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., et al. (2011). Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1216–1222. Doi: [10.3201/eid1707.110209](https://doi.org/10.3201/eid1707.110209).
- Padungtod, P., Kadohira, M., and Hill, G. (2008). Livestock production and foodborne diseases from food animals in Thailand. *Journal Veterinary Medicine Sciences*, 70, 873–879.
- Pallen MJ and Wren BW. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449 (7164) 835-842.
- Paraje, M. G. (2011). Antimicrobial resistance in biofilms. In A. Méndez-Vilas (Ed.). *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances* (pp. 736–744). Badajoz: Formatex.
- Paredi, G. Raboni, S, Bendixen, E., Almeida, A. de, & Mozzarelli, A. (2012) “Muscle to meat” molecular events and technological transformations: The proteomics insight. *Journal of Proteomics*, 75, 4275 – 429.
- Paulsen, L.T., Park, J.H., Choi, P. & Saier, M.H. (1997). A family of gram negative bacterial outer membrane factors the function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 156 (1) 1-8
- Pawlowski, A. C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H. A., McArthur, A. G., & Wright, G. D. (2016). A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nat. Commun.* 7:13803. Doi: [10.1038/ncomms13803](https://doi.org/10.1038/ncomms13803).
- Price, L. B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P. S., et al. (2012). *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio*3, 1–6. Doi: [10.1128/mBio.00305-11](https://doi.org/10.1128/mBio.00305-11).
- Poole, K. Krebs, K., McNally, C. & Neshat, S. (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology* 175 (22) 7363-7372.

- Potenski, C.J., Ghandi, M. & Mathews, K.R. (2003) Exposure of Salmonella Enteritidis to chlorine of food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 220 (2) 181-186.
- Quan, J., Cai, G., Ye, J., Yang, M., Ding, R., Wang, X., ... & Wu, Z. (2018). A global comparison of the microbiome compositions of three gut locations in commercial pigs with extreme feed conversion ratios. *Scientific Reports*, 8, 4536.
- Quintieri, L. Fanelli, F. & Caputo, L. (2019) Antibiotic Resistant Pseudomonas Spp. Spoilers in Fresh Dairy Products: An Underestimated Risk and the Control Strategies. *Foods*, 8 (9) 372; <https://doi.org/10.3390/foods8090372>.
- Ramirez, M. S., Nikolaidis, N., & Tolmashy, M. E. (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac (6')-Ib paradigm. *Frontiers Microbiology* 4:121. Doi: [10.3389/fmicb.2013.00121](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00121).
- Recacha, E., Machuca, J., Díaz de Alba, P., Ramos-Güelfo, M., Docobo-Perez, F., Rodríguez-Beltran, J., Blázquez, J. Pascual A., & Rodríguez-Martinez, J. M. (2017). Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *mBio*, 8, e00971–17.
- Ripolles-Avila, C. Hascoëta, A.S. Martínez-Suárez, J.V.. Capitac, R. & Rodríguez-Jereza, J.J. (2019). Evaluation of the microbiological contamination of food processing environments through implementing surface sensors in an Iberian pork processing plant: An approach towards the control of *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 99, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.013>.
- Rodríguez-Lázaro, D. Oniciuc, E.A. García, P.G. Gallego, D. Fernández-Natal, I. Domínguez-Gil, P. Eiros-Bouza, J.M. Wagner M. Nicolau, A.I. & Hernández M. (2017). Detection and Characterization of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Foods Confiscated in EU Borders. *Frontiers Microbiology*, 8, 1344. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01344>.

- Roncarati, D., & Scarlato, V. (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: From signal sensing to gene expression output. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*, 549–574.
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). The landscape of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, *117*(6) 245-250.
- Russo, P.; Spano, G.; Capozzi, V. (2017). Safety evaluation of starter cultures. In *Starter Cultures in Food Production*. (pp. 101–128). London: John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK.
- Saeedi, P. Yazdanparast, M., Behzadi, E. Salmanian, A.H. Mousavi, S.L. Nazaria, S. & Amani, J. (2017). A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals. *Microbial Pathogenesis*, *103*, 186-195.
- Samuels, A. N., Roggiani, M., Zhu, J., Goulian, M., & Kohli, R. M. (2019). The SOS response mediates sustained colonization of the mammalian gut. *Infection and Immunity*, *87*(2), e00711–18.
- Sánchez C. (2011) Bacterial pathogenesis: The importance of first impressions. *Nat Review Microbiology*, *9*, 630-631.
- Sasaki, Y., Haruna, M., Murakami, M., Hayashida, M., Ito, K., Noda, M., et al. (2013). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Hepatitis E* virus in swine livers collected at an abattoir. *Japanese Journal Infections Diseases* *66*, 161–164.
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) (2009). Assessment of antibiotic resistance effect of biocides. In *Scientific committee of Emergin and Newly Identified Health risks*. 19 january 2009. Europ. Comm. Brussels. [http://refhub.elsevier.com/S0740-0020\(16\)30370-7/sref36](http://refhub.elsevier.com/S0740-0020(16)30370-7/sref36).
- Schmithausen, R. M., Schulze-Geisthoevel, S. V., Heinemann, C., Bierbaum, G., Exner, M., Petersen, B., & Steinhoff-Wagner, J. (2018). Reservoirs and

- transmission pathways of resistant indicator bacteria in the biotope pig stable and along the food chain: A review from a one health perspective. *Sustainability*, 10 (11), 3967.
- Seija, V. & Vignoli, R (2006). Principales Grupos de Antibióticos. En *Temas de Bacteriología y virología Médica* (Pp. 631- 647).
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K. & Grossart H.P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontier in microbiology*, 4 (47) 1-13.
[http://www.frontiersin.org/Antimicrobials,_Resistance_and_Chemotherapy/10.3389/fmicb.2013.00047/abstract.](http://www.frontiersin.org/Antimicrobials,_Resistance_and_Chemotherapy/10.3389/fmicb.2013.00047/abstract)
- Shengyong N.G & Kurisawa, M. (2021). Integrating Biomaterials and Food Biopolymers for Cultured Meat Production. *Acta BioMaterialia*
[https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.017.](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.017)
- Shi, X. & Zhu, X., (2009). Biofil, formulation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 29 (9) 407-413.
- Silbergeld E, Graham J, & Price L. (2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual review of public health*: 29 (1):151-169.
- Singh, N. K., Wood, J. M., Karouia, F., & Venkateswaran, K. (2018). Succession and persistence of microbial communities and antimicrobial resistance genes associated with International Space Station environmental surfaces. *Microbiome*, 6, 204.
- Sobsey, M. D., Khatib, L. A., Hill, V. R., Alocilja, E., Pillai, S. (2006). "Air quality and emissions from livestock and poultry production/waste management systems". In J. M. Rice, D. F. Caldwell, and F. J. Humenik (Eds.): *Animal Agriculture and the Environment: National Center for Manure and Animal Waste Management White Papers*. USA: ASABE publication. (pp.609–666).
- Sofos, J.N., (2014). *Meat and meat products. Food Safety Management*. N. York: Elsevier, (pp. 119-162).

- Sosa, A.D.J. Amábile-Cuevas, C.F., Byarugaba, D.K. Hsueh, P.R. Kanuki, S. & Okeke, I. N. (Eds.) (2009). *Antimicrobial resistance in developing countries*. N. York: Springer.
- Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M. C., & Da Re, S. (2016). The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *mBio*, 7(4), e00868-16.
- Sun, J., Huang, T., Chen, C., Cao, T. T., Cheng, K., Liao, X. P., et al. (2017). Comparison of fecal microbial composition and antibiotic resistance genes from swine, farm workers and the surrounding villagers. *Scientific Report*, 7:4965. Doi: [10.1038/s41598-017-04672-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-04672-y).
- Tortora, G.J, Berdell, R., Funke, B.R. & Case. C.L. (2007). *Mecanismos de patogenicidad bacteriana. Introducción a la microbiología*. 9a. Ed. México: Editorial Panamericana.
- Tremblay, C. L., Letellier, A., Quessy, S., Daignault, D., & Archambault, M. (2012). Antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* in abattoir pigs and plasmid colocalization and cotransfer of tet(M) and erm(B) Genes. *Journal Food Proteins*. 75, 1595–1602. Doi: [10.4315/0362-028X.JFP-12-047](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-047).
- Truong, D., Franzosa, E., Tickle, T. L., Scholz, M., Weingart, G., Pasolli, E., ... Segata, N. (2015). MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nature Methods*, 12, 902–903.
- Ugarte-Ruiz, M., Gundogdu, O., Wassenaar, T., Ancochea, C., Porrero, M. C., Dorrell, N., et al. (2013). *Identification of Type VI secretion system (T6SS) in Spanish Campylobacter jejuni*. Poster at 17th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Aberdeen.
- Van der Bogaard, A.E. & Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14 (4) 327-335.

- Van Boeckel T., Brower C., Gilbert M., Grenfell B., Levin S., Robinson T. et al. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (18):5649-5654.
- Van Reenen, C. A. & Dicks, L.M. (2011). Horizontal gen transfer amongst probiotic lactic bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, 193 (3) 157-168.
- Valkova, N. Lépine, F., Valeanu, L. Dupont, M. Labrie, L., Bisailon, J.G., Beaudet, R., Shareck, F & Villemur, R. (2001). Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *enterobacter cloacae* strain EM. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (6) 2404-2409.
- Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., ... & Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10 (7), 2643–2669.
- Viegas, C., Faria, T., dos Santos, M., Carolino, E., Sabino, R., Quintal Gomes, A., & Viegas, S. (2016). Slaughterhouses fungal burden assessment: A contribution for the pursuit of a better assessment strategy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13 (3), 297.
- Vinderola, G.; Ouwehand, A.C.; Salminen, S.; von Wright, A. (2019). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 5th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J. Killgore, G.E. & Tenover, F.C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, 5650, 1569-1571.
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., & Wulf, M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1965–1966.

- WHO (World Health Organization) (2002). Antimicrobiol resistance. Fact sheet n° 164. Disponible en : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- WHO (World Health Organization) (2012). In: *The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action*. Geneve- Switzerland, WHO Press.
- WHO (World Health Organization) (2012). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 3rd Revision 2011*. Geneva: WHO Press.
- WHO (World Health Organization) (2014). *Antibiotic resistance: global report on surveillance* [Internet]. Hilary Cadman, Lindsay Martinez. Available from. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1&ua=1&ua=1.
- Woegebauer, M., Zeinzinger, J., Springer, B., Hufnagl, P., Indra, A., Korschineck, I., et al. (2014). Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph(3')-IIIa and aph(3')-IIa in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. enterica and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. *J. Med. Microbiol.* 63, 210–217. Doi: 10.1099/jmm.0.065789-0.
- Wu, H.J., Wang, A.H.J. & Jennings, M.P. (2008) Wu HJ, Wang AHJ and Jennings MP. Discovery of virulencefactors of pathogenicbacteria. *Curr Opin Chem Biol*, 12, 93-101.
- Yu, X.J., McGourty, K. & Liu M., (2010). Unsworth KE and Holden DW. pH Sensingby Intracellular Salmonella Induces Effector translocation. *Science* 5981 1040-1043.
- Zhang,Y. Yeh, E., Hall, G., Cripe, J. Bhagwat, A.A. & Meng, J. (2007) Characterization of Listeria monocytogenes isolated from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 47–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.010>
- Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., ... & Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110, 3435–3440.

Zipfel, P.F., Würzner, R, & Skerk, C. (2007).Review. Complement evasion of pathogens: Common strategies are shared by diverse organisms. *Molecular Immunology*, 16, 3850-3857.