



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de Grado en

## Ciencia y Tecnología de los alimentos

Evaluación de la termorresistencia de variantes resistentes a la ciprofloxacina de *Salmonella Typhimurium*

Evaluation of heat resistance of ciprofloxacin-resistant variants of *Salmonella Typhimurium*

Autor/es

Pardos Núñez, Celia

Director/es

Pagán Tomás, Rafael  
Campillo Pérez, Raúl

Facultad de Veterinaria

2024

# Índice

1. Resumen .....	1
2. Summary .....	2
3. Introducción.....	3
3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	3
3.1.1. Relevancia de <i>Salmonella</i> spp. en la salud pública .....	3
3.2. Resistencia a los antimicrobianos .....	4
3.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos .....	5
3.4. Métodos de control microbiano: tratamiento térmico .....	6
3.4.1. Cinética de inactivación microbiana por calor .....	7
3.4.2. Factores que afectan a la termorresistencia .....	8
3.5. Resistencia cruzada.....	9
4. Justificación y objetivos.....	11
5. Materiales y métodos .....	12
5.1. Reactivos utilizados .....	12
5.2. Obtención de las suspensiones bacterianas .....	12
5.3. Tratamiento térmico.....	13
5.4. Determinación de mutaciones genéticas en STVRC .....	14
5.5. Análisis estadístico.....	15
6. Resultados y discusión.....	16
6.1. Caracterización de la termorresistencia de STWT y STVRC .....	16
6.2. Evaluación de la termorresistencia de cepas aisladas de muestras ambientales .	20
6.3. Identificación de las mutaciones y su impacto en la respuesta bacteriana.....	21
7. Conclusiones.....	23
8. Conclusions .....	24
9. Valoración personal .....	25
10. Bibliografía.....	26

# 1. Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos, incluyendo la salmonelosis, son una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. Además, su tratamiento se ve dificultado en gran medida por el desarrollo de resistencia a los antibióticos (RAM), destacando esta problemática en el género *Salmonella*. La industria alimentaria desempeña un papel fundamental en el control de patógenos, y prácticas como el tratamiento térmico están ampliamente extendidas, aunque se desconoce la implicación de los mecanismos RAM en la termo-tolerancia.

El objetivo de este trabajo es caracterizar la termorresistencia de una variante de *Salmonella* Typhimurium LT2 resistente a ciprofloxacina (STVRC) previamente obtenida en el laboratorio. STVRC resultó ser más resistente al calor que su homóloga parental (STWT), duplicando el tiempo de tratamiento necesario para lograr 2 reducciones logarítmicas a 54 °C o incrementando el riesgo de supervivencia en más de 100 000 veces tras 5 min de tratamiento a 57 °C. El incremento de resistencia fue mayor a temperaturas bajas, lo que alerta del riesgo que puede suponer el desarrollo de RAM cuando se emplean técnicas culinarias como *sous vide*. También se caracterizó la termorresistencia de 5 cepas aisladas de muestras ambientales, pero ninguna mostró un comportamiento equiparable a STVRC. La variante STVRC presenta mutaciones en los genes *ramR*, *cyaA* y *rpoD*. Estos genes podrían guardar relación con la síntesis de bombas de eflujo, la regulación de metabolismo celular y la expresión de otros genes, y podrían ser causa directa de resistencia a ciprofloxacina y tolerancia cruzada al calor. En conclusión, la contaminación de los alimentos con bacterias RAM podría comprometer la eficacia de los tratamientos térmicos en la industria alimentaria y señalan la necesidad de indagar en la prevalencia de bacterias RAM en la cadena alimentaria y la implicación de los mecanismos RAM en la tolerancia cruzada al calor.

## 2. Summary

Foodborne illnesses, including salmonellosis, are among the major threats to public health worldwide. Moreover, their treatment is greatly hindered by the development of antibiotic resistance (AMR), with this issue being prevalent in the *Salmonella* genus. The food industry plays a crucial role in controlling pathogens, with practices such as thermal treatment being widely used, although the involvement of AMR mechanisms in heat tolerance is unknown.

The aim of this study is to characterize the heat resistance of a ciprofloxacin-resistant variant of *Salmonella* Typhimurium LT2 (STVRC) previously obtained in the laboratory. STVRC was found to be more heat-resistant than its parental counterpart (STWT), doubling the treatment time needed to achieve a 2-log reduction at 54°C or increasing the survival risk by more than 100,000 times after 5 minutes of treatment at 57°C. The increase in resistance was greater at lower temperatures, which raises concerns about the risk posed by the development of AMR when using culinary techniques such as *sous vide*. The heat resistance of 5 strains isolated from environmental samples was also characterized, but none showed behaviour comparable to STVRC. The STVRC variant presents mutations in the *ramR*, *cyaA*, and *rpoD* genes. These genes could be related to the synthesis of efflux pumps, the regulation of cellular metabolism, and the expression of other genes, and could be the direct cause of both ciprofloxacin resistance and cross-tolerance to heat. In conclusion, food contamination with AMR bacteria could compromise the effectiveness of thermal treatments in the food industry and highlights the need to investigate the prevalence of AMR bacteria in the food chain and the involvement of AMR mechanisms in cross-tolerance to heat.

### 3. Introducción

#### 3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

De acuerdo con los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2023a), alrededor de 600 millones de personas contraen alguna enfermedad tras consumir alimentos contaminados por agentes microbiológicos o químicos. Se estima que 420 000 personas pierden la vida cada año por este motivo y que 125 000 de estas muertes corresponden a niños menores de 5 años. Las alarmantes cifras de enfermedad y mortalidad lo convierten en uno de los principales problemas de salud pública a nivel global.

Gran parte de las enfermedades transmitidas por alimentos se deben a agentes bióticos y, según otro informe publicado por la OMS en 2015, a nivel mundial las bacterias son el agente biótico más implicado en las toxioinfecciones alimentarias, por delante de virus y protozoos. Entre los patógenos vehiculados por alimentos se encuentra el género *Salmonella* spp., perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, considerado por la OMS (2018) como una de las causas principales de enfermedades diarreicas. Si bien la salmonelosis en la mayoría de los casos es una enfermedad leve, puede resultar mortal, especialmente, en el caso de niños, ancianos o población inmunodeprimida.

##### 3.1.1. Relevancia de *Salmonella* spp. en la salud pública

Según un informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) (2023), en el año 2022 se notificaron más de 65 000 casos de salmonelosis en la Unión Europea, de los cuales 81 supusieron el fallecimiento de la persona afectada. La salmonelosis fue la segunda infección gastrointestinal más común después de la campylobacteriosis y la de mayor impacto directo en la salud en términos de número brotes y hospitalizaciones. *Salmonella Enteritidis* (67,3%) y *Salmonella Typhimurium* (13,1%) fueron los serotipos más habituales en los casos reportados, el primero asociado principalmente a huevos y ovoproductos mientras que el segundo, a carne de cerdo y derivados cárnicos y a alimentos listos para el consumo. Pese a la menor prevalencia de *S. Typhimurium*, se le atribuye una severidad mayor y supera a *S. Enteritidis* en tasas de hospitalización (Arnedo-Pena et al., 2017).

### 3.2. Resistencia a los antimicrobianos

Junto con la elevada incidencia de salmonelosis transmitida por alimentos, el tratamiento clínico de esta enfermedad se está viendo agravado por una de las mayores amenazas a las que se enfrenta la salud pública: la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (OMS, 2023b). De hecho, *Salmonella* spp. sigue incluida en la recientemente actualizada lista de patógenos resistentes a antibióticos de atención prioritaria (OMS, 2024) (**Figura 1**).

**Tabla 1.** Lista de patógenos de resistentes de atención prioritaria elaborada a partir de datos de la OMS (OMS, 2024).

Prioridad crítica	Prioridad elevada	Prioridad media
<p>Enterobacterias resistentes a carbapenem</p> <p>Enterobacterias resistentes a cefalosporina de 3<sup>a</sup> generación</p> <p><i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenem</p> <p><i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a rifampicina</p>	<p><i>Salmonella Typhi</i> resistente a fluoroquinolonas</p> <p><i>Shigella</i> spp. resistente a fluoroquinolonas</p> <p><i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenem</p> <p><i>Salmonella</i> no tifoidea resistente a fluoroquinolonas</p> <p><i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a cefalosporina de 3<sup>a</sup> generación y/o fluoroquinolonas</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina</p>	<p>Estreptococos del grupo A resistentes a macrólidos</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a macrólidos</p> <p><i>Haemophilus influenzae</i> resistente a ampicilina</p> <p>Estreptococos del grupo B resistentes a penicilina</p>

La RAM supone un riesgo para los avances de la medicina moderna, ya que dificulta el tratamiento de las infecciones y supone un riesgo para otros procedimientos médicos como la cirugía o la quimioterapia. Se estima que en el año 2019 la RAM en bacterias fue responsable directa de 1,27 millones de muertes en el mundo y que contribuyó a un total de 4,9 millones de muertes. Además, la RAM supone un coste significativo para la economía debido a que alarga las estancias en los hospitales y crea la necesidad de cuidados más caros e intensivos. A ello hay que sumarle su impacto negativo en la productividad del sector primario (OMS, 2023b). Aunque las RAM pueden darse de manera natural (James et al., 2021), el uso generalizado, excesivo e inadecuado de los antimicrobianos durante los últimos 80 años ha acelerado su aparición (Christaki, Marcou y Tofarides, 2020).

Así, *Salmonella* spp. se ha convertido en uno de los géneros en los que más se ha descrito RAM, hasta el punto de que se han observado los distintos patrones de RAM a lo largo de los serotipos

(Siceloff *et al.* 2021). En un estudio realizado por Peruzy *et al.* (2020) se analizaron 178 muestras de *Salmonella* frente a 10 antibióticos diferentes y una elevada proporción de los aislados fueron resistentes a ciprofloxacina (CIP) y otros antibióticos. Además, casi la mitad de las cepas que mostraron resistencia a algún antibiótico, mostraron resistencia a más de dos antibióticos, lo que se conoce como “multirresistencia”. En consecuencia, *Salmonella* spp. es un género considerado de prioridad elevada, especialmente debido a su resistencia a fluoroquinolonas, una familia de antibióticos entre los cuales se encuentra la CIP, que se utiliza habitualmente para el tratamiento de los casos severos de salmonelosis en humanos (Chang *et al.*, 2021).

### 3.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Munita y Arias (2016) explican que existen dos estrategias a través de las cuales los microorganismos desarrollan RAM. La primera estrategia consiste en la adquisición de DNA con genes de resistencia a través de transferencia genética horizontal entre individuos, mediante los mecanismos de transformación, transducción y conjugación. La segunda estrategia es la aparición de mutaciones aleatorias que se transfieren de manera vertical a la descendencia a través de la replicación (Munita y Arias, 2016). Estas mutaciones favorecen el desarrollo de mecanismos que dificultan la entrada de antibiótico a las células o que reducen su efectividad. Algunos de los más habituales son: expresión de bombas para el transporte activo de los antibióticos fuera de la célula (bombas de eflujo), modificaciones en la estructura de las envolturas celulares que afectan a su permeabilidad, alteración de las estructuras celulares “diana” sobre las que actúa el fármaco o expresión de enzimas que destruyen o modifican la estructura química del compuesto (Alenazy, 2022). Además, la asociación de las bacterias en biofilms también aumenta su tolerancia a los antibióticos (Singh, Ghosh y Chauhan, 2021).

Las fluoroquinolonas son una familia de antibióticos de amplio espectro que se emplean para tratar diferentes infecciones, incluyendo las causadas por el género *Salmonella*. A este grupo de fármacos pertenece la ciprofloxacina (CIP), habitual en medicina humana. Las estructuras diana de las fluoroquinolonas son los ácidos nucleicos y, más concretamente, inhiben la actividad de las topoisomerasas, los enzimas que regulan la topología del DNA (Bearson y Brunelle, 2015). Los mecanismos de resistencia a CIP suelen asociarse a mutaciones en los genes que transcriben las topoisomerasas o en los genes que regulan la expresión de porinas y bombas de eflujo (Coombs *et al.*, 2023).

Estas mutaciones suelen afectar a genes cromosómicos, aunque también se han descrito genes de resistencia a este compuesto asociados a plásmidos (Coombs et al., 2023), y ello podría contribuir a la diseminación de RAM por transferencia horizontal. En cepas de *E. coli* se ha observado que los genes RAM son capaces de resistir a tratamientos térmicos letales para las células y perdurar en el medio, pudiendo ser asimilados por otras bacterias a través del mecanismo de transformación (Le-Devendec, Jouy y Kempf, 2018) (Taher et al., 2020). Esta podría no ser la única relación entre los métodos de conservación de alimentos y la RAM.

### 3.4. Métodos de control microbiano: tratamiento térmico

La industria alimentaria ha implementado diversas estrategias con el fin de prevenir y reducir la contaminación y presencia de patógenos en sus productos. Aun así, en el año 2022, en la UE tuvo lugar un incremento del 32,8% en los brotes asociados a alimentos respecto al periodo 2018 – 2021 (EFSA y ECDC, 2023). Ello indica que las medidas de prevención y control en la cadena agroalimentaria no son suficientes para evitar la transmisión al consumidor final de patógenos, que, en determinados casos, podrían ser RAM.

Resulta fundamental utilizar materias primas de calidad, cuidar la higiene personal, llevar a cabo los planes de limpieza y desinfección y respetar las buenas prácticas de fabricación y de manipulación (Sahoo, Panigrahi y Aradwad, 2022). Además, la industria alimentaria cuenta con una gran variedad de métodos de conservación de los alimentos que permiten, bien inhibir el crecimiento microbiano, tales como la refrigeración, congelación, el uso de las atmósferas protectoras, la reducción de la actividad de agua mediante la deshidratación o la liofilización, la fermentación, la acidificación o el uso de conservantes químicos; o bien su inactivación, como el calor u otras tecnologías más novedosas como los tratamientos de altas presiones hidrostáticas (APH) (Mañas y Pagán, 2005). No obstante, el tratamiento térmico sigue siendo una de las técnicas más empleadas para controlar patógenos, incluyendo *Salmonella* spp., por su efectividad, sencillez operacional y coste relativamente bajo.

La intensidad del tratamiento térmico depende de la temperatura a la que se realice y del tiempo que dure el tratamiento y determina su eficacia. En la industria alimentaria, se habla fundamentalmente de dos tipos de tratamiento: pasteurización, que es el tratamiento que garantiza la inactivación de las formas vegetativas de microorganismos patógenos, y esterilización, inactivación de las formas vegetativas y esporuladas de microorganismos

patógenos y no patógenos. En ambos casos, la resistencia al calor de los microorganismos a eliminar es la que determina la intensidad de tratamiento requerida (Fellows, 2019).

### 3.4.1. Cinética de inactivación microbiana por calor

La inactivación microbiana por calor se basa en que los microorganismos mueren, no cuando se alcanza una determinada temperatura, sino cuando reciben una determinada cantidad de calor. En principio, se considera que la inactivación microbiana durante un tratamiento térmico sigue una cinética exponencial o de primer orden y que, al representar el logaritmo del número de supervivientes frente al tiempo, se obtiene una línea recta que se denomina “curva de supervivencia”. La inversa negativa de la pendiente de la curva de supervivencia, también denominado valor  $D_T$ , se define como el tiempo de tratamiento, a una temperatura determinada ( $T$ ), requerido para reducir la población microbiana a la décima parte. El valor  $D_T$  permite comparar la termorresistencia de diferentes microorganismos y, simultáneamente, calcular el tiempo de tratamiento necesario para lograr un determinado nivel de inactivación ( $F_T$ ) (Hassani-Zerrouk, 2006).

La termorresistencia de un microorganismo, por lo general, también depende exponencialmente de la temperatura de modo que la representación del logaritmo de los valores  $D_T$  frente a la temperatura permite obtener la gráfica de termodestrucción. La inversa negativa de la pendiente de esta recta se denomina “valor z”, definido como el número de grados centígrados que hay que aumentar la temperatura de tratamiento para reducir el valor  $D_T$  a la décima parte. Además, dado que el tiempo de tratamiento (valores  $F_T$ ) se calcula multiplicando el valor  $D_T$  por el número de reducciones logarítmicas deseadas, se puede construir una recta paralela a la de termodestrucción, que se obtiene al representar el logaritmo de los valores  $F_T$  frente a las diferentes temperaturas de tratamiento, y se conoce como “línea TDT” (*Thermal Destruction Time*). A partir de la inversa negativa de su pendiente se puede obtener, también, el valor z (Hassani-Zerrouk, 2006).

No obstante, son típicos los casos en los que la inactivación de poblaciones bacterianas, como *Salmonella* spp., no siguen una cinética exponencial dando lugar a desviaciones de la linealidad en las gráficas de supervivencia. Las desviaciones de la linealidad más frecuentes son los perfiles cóncavos o “colas”, los perfiles convexos u “hombros” y los perfiles “sigmoideos”, que presentan al mismo tiempo hombro y cola. En estas situaciones no es adecuado aplicar la cinética de primer orden para ajustar el perfil de la curva de supervivencia y es necesario ajustar los datos experimentales a modelos que consideren estas desviaciones de la linealidad.

Entre ellos, uno de los modelos más utilizados es el basado en la distribución de Weibull (Mafart et al., 2002).

Este modelo se basa en una distribución de probabilidad continua, cuyos parámetros básicos son el parámetro de escala ( $\delta$ ) y el parámetro de forma ( $\rho$ ). El parámetro  $\delta$  se define como el tiempo necesario para lograr la primera reducción decimal. El parámetro  $\rho$  indica que la función es cóncava cuando  $\rho > 1$ , lineal cuando  $\rho = 1$  y convexa cuando  $\rho < 1$ . Así, la función de supervivencia viene dada por la **Ecuación 1** (Gómez et al., 2024).

$$\log_{10} \left( \frac{N_t}{N_0} \right) = - \left( \frac{t}{\delta} \right)^\rho$$

**Ecuación 1.** Ecuación de Weibull según Mafart et al. (2002), donde  $N_t = \log_{10}$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL en el tiempo  $t$  de tratamiento,  $N_0 = \log_{10}$  UFC/mL en el  $t_0$  del tratamiento,  $\delta$  = parámetro de escala (expresado en unidades de tiempo para lograr la primera reducción decimal) y  $\rho$  = parámetro de forma (adimensional).

### 3.4.2. Factores que afectan a la termorresistencia

El impacto del tratamiento térmico sobre los microorganismos depende de numerosos factores denominados intrínsecos (o genotípicos) y extrínsecos, también denominados ambientales (Cebrián, Condón y Mañas, 2017). Los factores ambientales se clasifican en aquellos que ejercen su influencia antes, durante o tras el tratamiento térmico. Entre los que actúan antes del tratamiento cabe destacar aquellos que afectan al crecimiento microbiano (fase de crecimiento, temperatura de cultivo, composición y características fisicoquímicas del medio de crecimiento, exposición a condiciones de estrés, etc.). Los factores que actúan durante el tratamiento están relacionados fundamentalmente con la intensidad de este (tiempo y temperatura) y con la composición y características fisicoquímicas del medio de tratamiento (pH, actividad de agua, etc.). Finalmente, aquellos que actúan tras el tratamiento afectan a la recuperación celular, y de nuevo están relacionados con las condiciones de cultivo (tiempo, temperatura, composición del medio de recuperación, etc.). Por ejemplo, el pH ligeramente ácido (Mañas et al., 2003; Blackburn et al., 1997) o el descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ) (Wang y Yang, 2022) contribuyen a una mayor resistencia al calor debido a que inducen, respectivamente, descensos de la fluidez de la membrana plasmática y cambios a nivel metabólico. Otro de los factores que en mayor medida puede determinar la resistencia al calor de los microorganismos es el conjunto

de reacciones metabólicas que se desencadenan en las células ante el aumento de temperatura: la denominada “respuesta de estrés al choque térmico”. En especies de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Salmonella* y *Escherichia*, la transcripción de genes está regulada por los “factores sigma ( $\sigma$ )”, un grupo de proteínas que se unen al enzima RNA-polimerasa y que reconocen determinados promotores en la hebra de DNA. El principal factor sigma es  $\sigma^D$  (*rpoD*) es responsable de la transcripción de la mayoría de los genes constitutivos necesarios para el normal funcionamiento de la célula durante el crecimiento exponencial. Sin embargo, la respuesta de estrés al choque térmico está fundamentalmente mediada por los factores  $\sigma^H$  (*rpoH*) y  $\sigma^E$  (*rpoE*), los cuales permiten la transcripción y síntesis de las llamadas “Proteínas de Choque Térmico (HSP)”. Las HSP son un grupo de proteínas, en su mayoría chaperonas y proteasas, cuya función está relacionada con estabilizar otras proteínas, reparar proteínas parcialmente degradadas y eliminar proteínas dañadas y potencialmente tóxicas (Arsène, Tomoyasu y Bakau, 2000; Bang et al., 2005; Noor, 2015).

La expresión de los factores sigma y la síntesis de HSP parece ser una de las causas de que las células bacterianas presenten mayor termorresistencia cuando se cultivan a temperaturas superiores (Pagán, et al 1999) o cuando se encuentran en fase estacionaria (Cebrián et al., 2007). También se ha observado que la respuesta al estrés de choque térmico favorece que las células expuestas a tratamientos térmicos subletrales presenten mayor tasa de supervivencia en tratamientos posteriores (Kim et al, 2021).

Los mecanismos desarrollados por las bacterias para adquirir una mayor tolerancia al tratamiento térmico, en especial aquellos que implican cambios en las membranas plasmáticas o en el metabolismo celular, guardan cierta similitud con las vías de resistencia a otros antimicrobianos, incluyendo los antibióticos.

### 3.5. Resistencia cruzada

La resistencia cruzada es el fenómeno por el cual los mecanismos de defensa que los microorganismos desarrollan para hacer frente a un estrés determinado le son útiles para soportar otro tipo de condiciones adversas (Coombs et al., 2023).

En la literatura científica abundan los artículos que relacionan el desarrollo de mayor tolerancia a biocidas con resistencia cruzada a antibióticos, y, en particular, diversos estudios señalan a las bombas de eflujo como la principal causa de este tipo de resistencia (Kampf, 2018; Douarre et

al., 2022). También se ha observado lo contrario, que se puede atribuir a los mecanismos RAM mayor resistencia a sustancias como los ácidos orgánicos (Oguadinma, Mishra y Kumar, 2023).

Sin embargo, las resistencias cruzadas no son un fenómeno que se dé exclusivamente entre métodos de naturaleza química. La tolerancia a antimicrobianos naturales, como el resveratrol o el carvacrol, se ha relacionado con un aumento de la termorresistencia en distintos patógenos (Oliveira, Domingues y Ferreira, 2017; Pagán et al. 2023). También se ha encontrado relación entre la supervivencia a tratamientos de shock térmico y una menor sensibilidad a APH en cepas de *E. coli* (Gayán et al., 2016).

El tratamiento térmico como potencial causa de RAM es un campo menos explorado. No obstante, existen estudios que relacionan los factores sigma, y en concreto el gen *rpoH* con la sensibilidad a antibióticos (Powell y Young, 1991; Williamson et al.; 2023). Además, debido a que algunos mecanismos RAM afectan a la membrana plasmática y al metabolismo celular, es razonable plantear la posibilidad de que las cepas mutantes presenten mayor tolerancia al tratamiento térmico. Si esto ocurriese, sería más probable su supervivencia a los tratamientos térmicos utilizados en la industria alimentaria y patógenos RAM podrían llegar al consumidor final causando enfermedades más difíciles de tratar.

## 4. Justificación y objetivos

La RAM es uno de los principales desafíos a los que se enfrenta la salud pública en la actualidad, ya que, no solo afecta negativamente al bienestar de animales y humanos, sino que también supone una carga para el sistema sanitario y un sobrecoste para la economía mundial. Cada vez son más frecuentes los casos que requieren el empleo de antibióticos de última línea de defensa ante la ineeficacia de los antibióticos convencionales, y el descubrimiento de nuevos fármacos podría no avanzar suficientemente rápido. Por ello, es probable que en el futuro la RAM continúe siendo una de las grandes amenazas.

*Salmonella* spp. es una de las principales zoonosis en países desarrollados y una importante causa de mortalidad a nivel mundial. Además, en este género el fenómeno RAM se detecta con relativa frecuencia. Entre las muchas estrategias que se llevan a cabo a lo largo de la cadena alimentaria para prevenir y controlar microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. el tratamiento térmico destaca por su eficacia, su sencillez operacional y su bajo coste. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto los mecanismos que confieren RAM podrían contribuir a una mayor termorresistencia.

Este trabajo tiene como objetivo general caracterizar la termorresistencia de una cepa de *Salmonella* Typhimurium LT2 resistente a CIP (STVRC) que había mostrado un incremento en su resistencia al tratamiento térmico en estudios previos.

Para lograr dicho objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la termorresistencia de STWT y STVRC, mediante la obtención de curvas de supervivencia a diferentes temperaturas y la gráfica TDT.
- Comparar la termorresistencia de STWT y STVRC con cepas resistentes a CIP aisladas de muestras ambientales.
- Identificar las mutaciones que presenta la cepa STVRC y discutir su posible implicación en la resistencia directa a CIP y la resistencia cruzada al tratamiento térmico

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Reactivos utilizados

Para obtener las suspensiones bacterianas de trabajo (cultivos) se empleó como medio el caldo Mueller Hinton con ajuste de cationes (MHB) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo en tampón citrato-fosfato McIlvaine ajustado a pH 7 (McI), preparado a partir de di-sodio de hidrógeno fosfato anhidro (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y ácido cítrico 1-hidrato (PanReac). El diluyente empleado tanto en la resuspensión como en las diluciones decimales realizadas en los tratamientos fue tampón fosfato salino (“phosphate buffered saline”, PBS) (Sigma-Aldrich).

El mismo diluyente se utilizó para preparar las disoluciones requeridas para los recuentos en placa. Para el recuento de microorganismos se utilizó como medio nutritivo agar tripticasa-soja enriquecido con extracto de levadura al 0,6% (p/v) (TSAEL) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

### 5.2. Obtención de las suspensiones bacterianas

En este estudio se utilizó la cepa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 como cepa salvaje (STWT), adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 722), y 1 variante resistente a CIP (STVRC) obtenida previamente en nuestro laboratorio mediante la realización de experimentos de adaptación evolutiva en los que la cepa STWT fue expuesta a dosis cada vez mayores de CIP. En los experimentos de determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), STVRC fue capaz de crecer hasta una concentración de 0,25 mg/L, multiplicando la resistencia de su homóloga parental (0,008 mg/L) en más de 30 veces y cumpliendo con el criterio de resistencia a CIP (0,06 mg/L) establecido por el ECDC (2021).

También se utilizaron 5 cepas de *S. Typhimurium* aisladas en muestras ambientales procedentes de granjas (STG<sub>1</sub>, STG<sub>2</sub>, STG<sub>3</sub>, STG<sub>4</sub>, STG<sub>5</sub>) y cedidas por la investigadora Clara Marín, del Centro de Investigación y Tecnología Alimentaria de Aragón (CITA), las cuales mostraron resistencia a CIP en los experimentos de determinación de CMI (STG<sub>1</sub> = 4 mg/L; STG<sub>2</sub> = 0,5 mg/L; STG<sub>3</sub> = 0,5 mg/L; STG<sub>4</sub> = 0,5 mg/L; STG<sub>5</sub> = 0,5 mg/L). La identidad de estos aislados se confirmó mediante secuenciación del gen 16S.

Para la preparación de las suspensiones microbianas, los pre-cultivos se prepararon a partir de

colonias aisladas en placas de TSAEL, que fueron inoculadas en tubos de ensayo con 5 mL de MHB e incubadas a 37 °C durante 16 h (Incubig Selecta, Barcelona, España) en agitación a 130 revoluciones por minuto (rpm) (Heidolph Vibramax 100, Schwaback, Alemania). Una vez obtenido el pre-cultivo, se procedió a la inoculación de frascos con 10 mL de MHB con el volumen necesario para alcanzar una concentración de  $10^6$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL, y se incubaron a 37 °C durante 24 h en agitación a 130 rpm. De esta forma se obtuvieron los cultivos, cuya concentración en fase estacionaria fue, aproximadamente, de  $10^9$  UFC/mL.

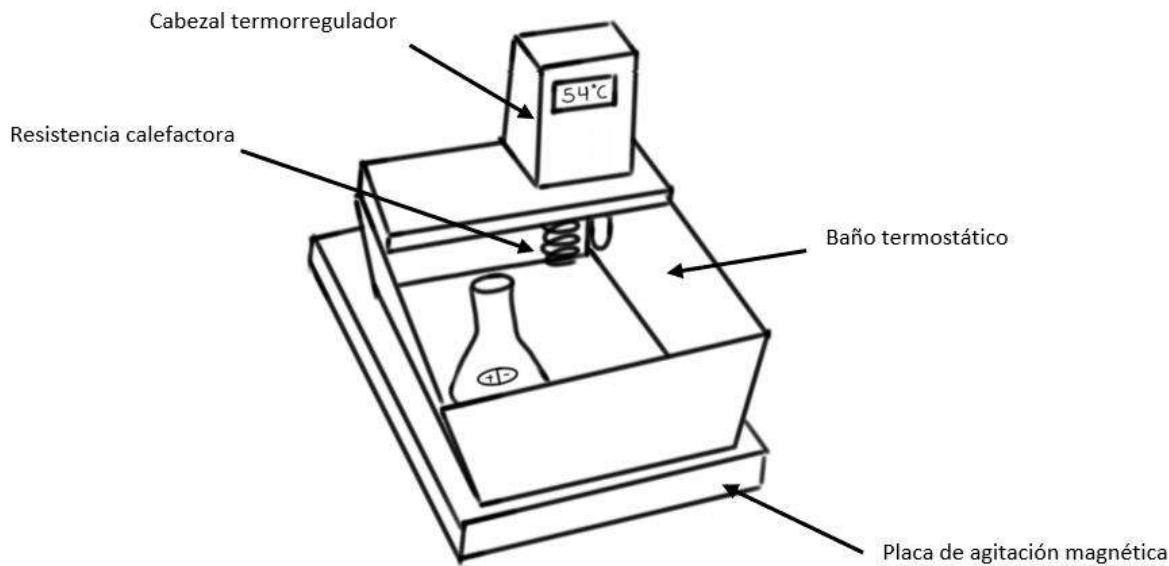
### 5.3. Tratamiento térmico

Antes de cada tratamiento, se centrifugó 1 mL del cultivo a tratar en una microcentrífuga (Mini Spin, Eppendorf, Hamburgo Alemania) a 12 000 rpm durante 3 min y se procedió a la re-suspensión del pellet en 1 mL de PBS.

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo en matraces con 100 mL de McI, alojados en un baño termostático equipado con un cabezal termorregulador (Serie CC-1, Huber, Berlin, Alemania), y en agitación constante (Mix 6, 2mag AG, Múnich, Alemania) (**Figura 1**). En todos los casos, la concentración del inóculo inicial fue aproximadamente  $10^9$  UFC/mL. La temperatura en el interior de los matraces se controló utilizando una sonda de temperatura conectada a un datalogger (Almemo® 2450, Alhorn, Holzkirchen, Alemania).

Las cepas STWT y STVRC se sometieron a tratamientos a tres diferentes temperaturas (54, 57 y 60 °C). Cuando se trataron a 54 °C, el tiempo de tratamiento fue de 20 min y se tomaron alícuotas cada 2 min; a 57 °C, el tiempo de tratamiento fue 5 min y se tomaron alícuotas cada 30 s; y a 60 °C, el tiempo de tratamiento fue 1 min y se tomaron alícuotas cada 10 s.

Por otra parte, las cepas aisladas de muestras de ambientales se sometieron a un tratamiento de inactivación a punto final. Para compararlas con STWT y STVRC, este tratamiento se realizó a 57 °C durante 3,5 min, por ser este el punto en el que se observó la mayor diferencia entre STWT y STVRC. En todos los casos, las alícuotas tomadas se diluyeron en PBS y se sembraron en TSAEL por homogenización en masa. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.



**Figura 1.** Esquema del equipo utilizado en el tratamiento térmico.

## 5.4. Determinación de mutaciones genéticas en STVRC

Con anterioridad a este estudio, se realizó la secuenciación del genoma completo de STWT y de STVRC y se identificaron las modificaciones genéticas que la VR presentaba en comparación con su homóloga parental (**Tabla 2**). Se identificaron tres mutaciones: la variación de un nucleótido único de una citosina por una guanina en el gen STM0580 (comúnmente referido como *ramR*), una inserción con cambio en el marco de lectura en el gen *cyaA* y una inserción de tres nucleótidos sin cambio en el marco de lectura en el gen *rpoD*.

**Tabla 2.** Mutaciones descritas en la variante STVRC en comparación con STWT

Tipo de mutación	Secuencia afectada	Gen afectado	Función
SNV	G74C – Gly25Ala	STM0580 ( <i>RamR</i> )	Codifica supuesta proteína reguladora (regulador transcriptacional de RamA)
Ins con CML	ATGA 2252	STM3939 ( <i>cyaA</i> )	Codifica enzima Adenilato ciclase
Ins sin CML	GCG 1764	STM3211 ( <i>rpoD</i> )	Codifica factor $\sigma^D$

SNV: Variación de Nucleótido Simple; Ins: inserción, CML: Cambio del Marco de Lectura

En este trabajo se discute el papel de las mutaciones descritas en la resistencia directa a CIP y cruzada al calor y otros métodos de conservación de acuerdo con la bibliografía consultada. Y a la información disponible en bases de datos como: The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (2024), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (2024) y National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2024).

## 5.5. Análisis estadístico

Los resultados de esta investigación se establecieron a partir de los datos arrojados por un mínimo de tres réplicas independientes, llevadas a cabo en días distintos bajo las mismas condiciones de tratamiento.

Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism® versión 8.2.4 para determinar e ilustrar los promedios de los recuentos obtenidos las diferentes réplicas de los tratamientos de inactivación. La desviación estándar del promedio de los resultados obtenidos de las réplicas independientes se representa mediante barras de error.

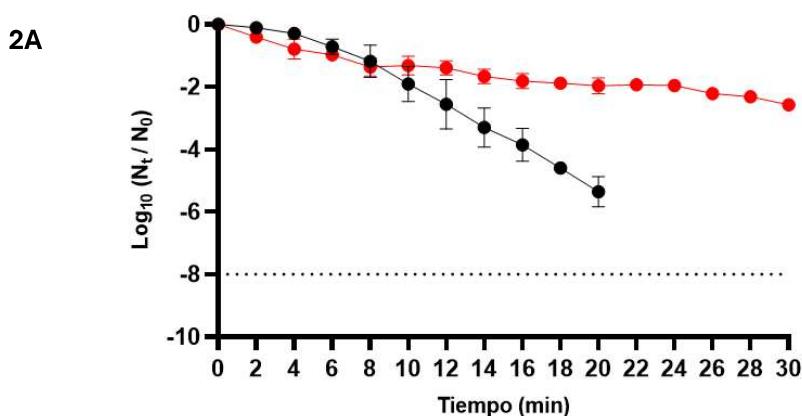
Este mismo programa se utilizó para ajustar los datos experimentales al modelo basado en la distribución de Weibull (Mafart et al., 2002) y se determinaron, para cada caso, los valores de los parámetros  $\delta$  y  $\rho$  (**Ecuación 1**). La bondad del ajuste se evaluó a partir de los valores del parámetro  $R^2$ , el  $R^2$  ajustado y el error cuadrático medio (ECM). Además, se realizó una prueba  $t$  de Student para determinar la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada cepa en las distintas condiciones de tratamiento, considerando que las diferencias eran significativas cuando  $p \leq 0,05$ .

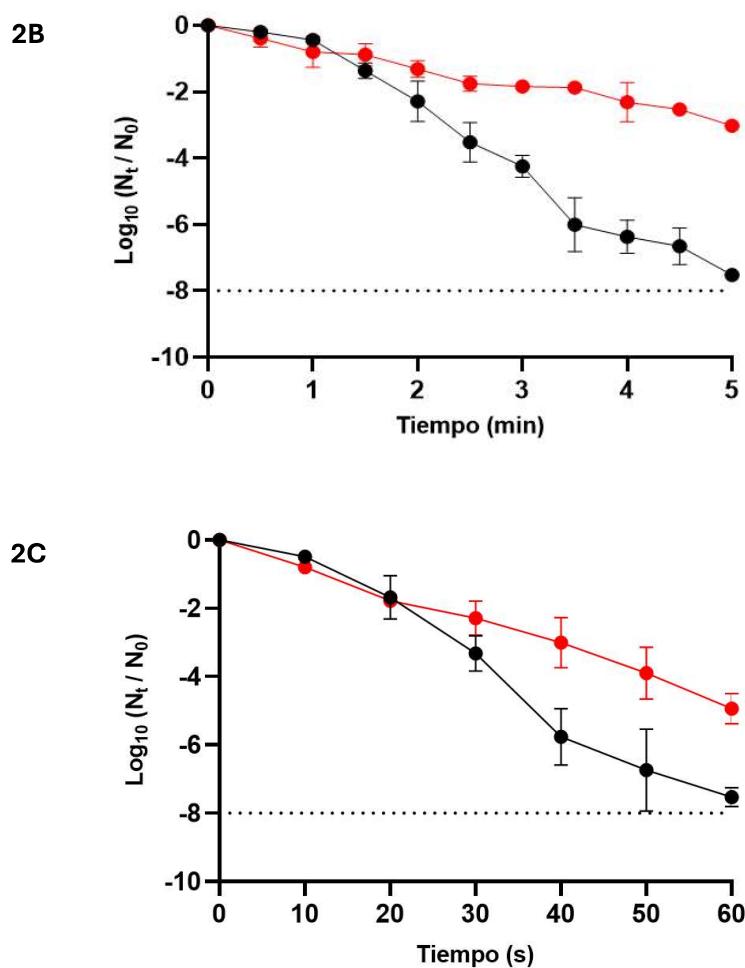
## 6. Resultados y discusión

La posible relación en bacterias entre RAM y resistencia a los tratamientos de conservación mediante calor ha sido explorada en microorganismos como *Yersinia enterocolitica* (Doherty, McMahon y Sheridan, 1998) o *S. Typhimurium* DT104 (Walsh et al., 2005), sin llegar a establecer relación alguna entre ambas. Yehia et al. (2020) sí que describieron una mayor termorresistencia en aislados de *S. aureus* resistentes a meticilina (antibiótico betalactámico), pero, al no disponer de la cepa parental, no pudieron atribuir de forma directa la menor sensibilidad al calor a los mecanismos RAM. El grupo de investigación al que me he incorporado para realizar trabajo ha aislado previamente variantes resistentes (VRs) a CIP a partir de una cepa parental de *Salmonella* Typhimurium. Concretamente, la cepa STVRC resultó 31,25 veces más resistente al antibiótico. Tras su caracterización fenotípica y genotípica y la comparación de su genoma con la cepa parental, se han descrito las mutaciones que podrían estar involucradas en el incremento de resistencia directa (**Tabla 2**).

### 6.1. Caracterización de la termorresistencia de STWT y STVRC

La caracterización de la termorresistencia de la cepa parental y de la VR consistió en obtener sus gráficas de supervivencia a 54 °C, 57 °C y 60 °C en medio de laboratorio (**Figura 2**). Debido a que las gráficas no mostraron un perfil lineal, se procedió a su ajuste al modelo basado en la distribución de Weibull (**Tabla 3**). A partir de los tiempos para conseguir 3 reducciones decimales se obtuvo la gráfica TDT (**Figura 3**), permitiendo, de este modo, comparar la termorresistencia de ambas cepas a cualquier temperatura de tratamiento.





**Figura 2.** Gráfica de supervivencia ( $\log_{10} N_t / N_0$ ) de la cepa parental (STWT) (●) y de la variante resistente obtenida en el laboratorio (STVRC) (●) durante distintos tratamientos isotérmicos: 54 °C (2A), 57 °C (2B) y 60 °C (2C).  $N_0 = \log_{10}$  UFC/mL en el  $t_0$  del tratamiento.  $N_t = \log_{10}$  UFC/mL en cada punto del tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar ( $s$ ) del promedio de 3 réplicas independientes. La línea discontinua representa el límite de detección.

Como se observa en la **Figura 2**, la STVRC mostró mayor resistencia que la STWT a cualquier temperatura de tratamiento. Por ejemplo, a 54 °C se necesita el doble de tiempo para lograr 2 reducciones logarítmicas de STVRC que de STWT (20 min frente a 10 min). Del mismo modo, mientras que tras 5 minutos de tratamiento a 57 °C se habían logrado aproximadamente 7,5 ciclos logarítmicos de reducción de la cepa parental, el tratamiento térmico tan solo logró la reducción de aproximadamente 2,5 ciclos logarítmicos de la VR, lo que implica un incremento del riesgo de supervivencia de aproximadamente 100 000 veces. Por el contrario, a 60 °C, si bien la tolerancia

de la cepa STVRC fue superior a la de STWT, la diferencia entre ambas cepas fue aparentemente menos notoria.

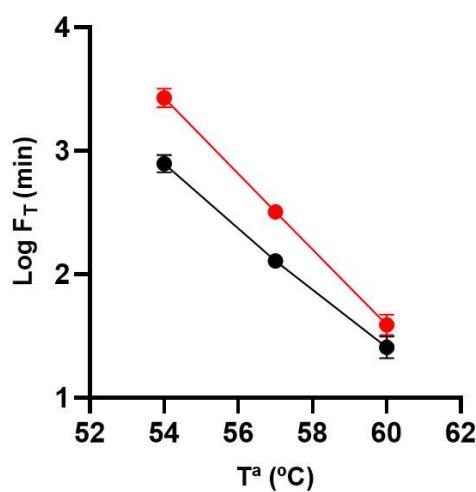
Como se ha mencionado anteriormente, la **Figura 2** muestra que las curvas de supervivencia de ambas cepas se desvían ligeramente de la cinética de inactivación microbiana de primer orden. En este sentido, se aprecia, incluso, un ligero hombro en la curva de STWT a 54 °C, posiblemente relacionado con la acumulación de daños subletales durante los primeros estadios del tratamiento a baja temperatura (Peleg, 2000). A la vista de estos resultados, los datos experimentales se ajustaron al modelo de Weibull. Los valores de los parámetros  $\delta$  y  $\rho$  y la bondad del ajuste en se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Parámetros  $\delta$  y  $\rho$  obtenidos tras ajustar al modelo basado en la distribución de Weibull los resultados experimentales de las curvas de supervivencia de STWT y STVRC tras tratamientos isotérmicos a 54 °C, 57 °C y 60 °C. Resultados expresados como la media ± desviación estándar de tres réplicas. Los valores con letras (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) diferentes indican la existencia de diferencias significativas en una prueba *t* de Student ( $p \leq 0,05$ ). Bondad del ajuste expresada a través de los parámetros  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado y ECM.

T <sup>a</sup> (°C)	Cepas	$\delta$ (min)	$\rho$	$R^2$	$R^2$ ajustado	ECM
54 °C	STWT	400,2 ± 155,2 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,54 <sup>a</sup>	0,9904	0,9880	0,1574
	STVR1	330,7 ± 92,8 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,9150	0,8952	0,1871
57 °C	STWT	55,4 ± 15,3 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,9668	0,9572	0,4404
	STVR1	91,2 ± 2,8 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,9271	0,9089	0,2520
60 °C	STWT	11,3 ± 4,1 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,9788	0,9674	0,4320
	STVR1	15,0 ± 6,7 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,9722	0,9583	0,2589

Cuando se comparan los valores del parámetro  $\delta$  (tiempo de tratamiento para conseguir la primera reducción decimal de la población microbiana) obtenidos para cada cepa, únicamente se observaron diferencias significativas en el tratamiento a 57 °C (**Figura 2B**); no obstante, las diferencias entre las gráficas de supervivencia son evidentes a tiempos más prolongados de

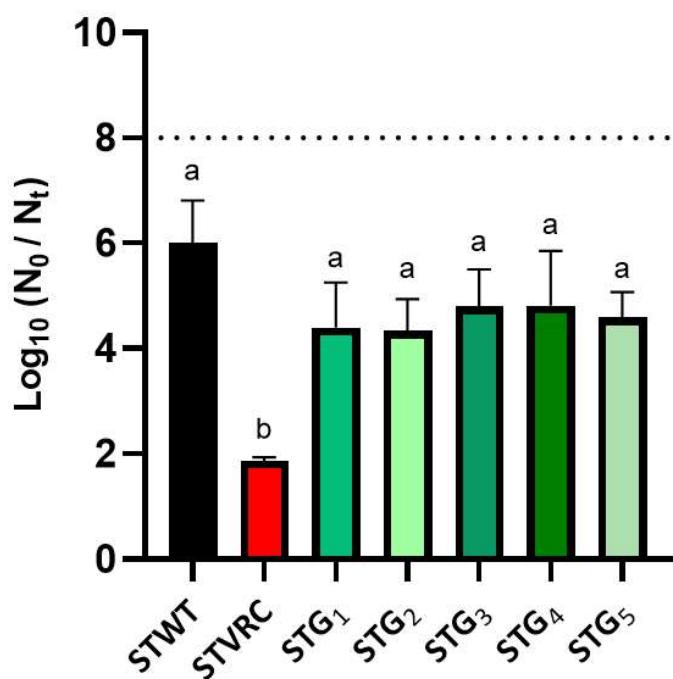
tratamiento, lo que se debe a las diferencias observadas en los valores  $p$ . Atendiendo al parámetro  $\rho$  (factor de forma), en los tratamientos a 54 °C y 57 °C, las curvas de supervivencia de STWT tienen tendencia a la concavidad ( $\rho > 1$ ), mientras que las curvas de STVRC tienden a la convexidad ( $\rho < 1$ ). Estos valores explican la aparentemente menor termorresistencia que presenta la cepa mutante al inicio de los tratamientos en comparación con STWT, como con el posterior cambio de comportamiento. En el tratamiento a 60 °C, ambas cepas presentan tendencia a la concavidad, lo cual coincide con la aparente similitud entre sus curvas de supervivencia a dicha temperatura. A partir de los parámetros  $\delta$  y  $\rho$ , y aplicando la ecuación del modelo basado en la distribución de Weibull descrita en el apartado 3.3.1. (**Ecuación 1**), se estimaron los tiempos necesarios para lograr 3 ciclos logarítmicos de inactivación de STWT y STVRC, observándose diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre ambas cepas a 54 y 57 °C. A partir de estos valores, se construyeron las líneas TDT. En la **Figura 3** se observa que la línea TDT para la destrucción de 3 ciclos logarítmicos de la cepa STVRC es superior a la de STWT. No obstante, el valor  $z$  de la cepa STVRC es menor que el de su homóloga parental (3,27 °C vs 4,04 °C), de modo que las líneas TDT no sean paralelas y, se observa como la diferencia de termorresistencia entre las cepas se va reduciendo a medida que se incrementa la temperatura de tratamiento. Estos resultados parecen indicar que la inactivación de este tipo de bacterias resistentes representaría un menor peligro cuanto más elevada sea la temperatura de tratamiento, y, por el contrario, alertan del peligro que podrían suponer las técnicas de cocinado a baja temperatura, como *sous vide*, ya que los binomios tiempo-temperatura que se utilizan podrían ser insuficientes para inactivar patógenos RAM, pudiendo llegar al consumidor final a través de este tipo de alimentos.



**Figura 3.** Línea TDT de la cepa parental (STWT) (●) y de la variante resistente obtenida en el laboratorio (STVRC) (●) para un nivel de inactivación de 3 ciclos logarítmicos. Las barras de error representan la desviación estándar ( $s$ ) del promedio de 3 réplicas independientes

## 6.2. Evaluación de la termorresistencia de cepas aisladas de muestras ambientales

Los resultados anteriores confirman que la VR a CIP presenta mayor termorresistencia que su homóloga parental en el rango de temperaturas de tratamiento estudiado, lo cual puede deberse a la implicación de los genes RAM en una supuesta respuesta al estrés térmico. Por ello, se plantea si cepas de *Salmonella* Typhimurium resistentes a CIP aisladas de muestras ambientales mostrarían igualmente una elevada resistencia al calor. Con este propósito se evaluó la resistencia al calor de muestras aisladas en granjas (STG<sub>1</sub>, STG<sub>2</sub>, STG<sub>3</sub>, STG<sub>4</sub> y STG<sub>5</sub>) en un tratamiento a punto final a 57 °C durante 3,5 min, por ser este el punto en el que STWT y STVR1 mostraron mayor diferencia en cuanto a termorresistencia.



**Figura 4.** Ciclos logarítmicos de inactivación ( $\log_{10} N_t / N_0$ ) de la cepa parental (STWT), la variante resistente obtenida en el laboratorio (STVRC) y las cepas aisladas de muestras ambientales resistentes a CIP (STG<sub>1</sub> – STG<sub>5</sub>) tras un tratamiento isotérmico a punto final a 57 °C durante 3,5 min.  $N_0 = \log_{10}$  UFC/mL en el  $t_0$ .  $N_t = \log_{10}$  UFC/mL en el tiempo  $t$ . Las barras de error representan la desviación estándar ( $s$ ) del promedio de 3 réplicas independientes. La línea discontinua representa el límite de detección. Los valores con letras (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) diferentes indican la existencia de diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Como se muestra en la **Figura 4**, la concentración inicial de todos los aislados de muestras ambientales se redujo entre 4 y 5 unidades logarítmicas, de manera que mostraron una termorresistencia ligeramente superior a STWT (que se inactivó 6 ciclos logarítmicos), aunque no lo suficiente como para poder considerar significativa la diferencia ( $p < 0.05$ ). Donde sí se aprecian diferencias significativas, tanto en relación con STWT como a los aislados de muestras ambientales, es en el comportamiento de STVRC, la cual experimentó tan solo 2 ciclos logarítmicos de inactivación en las mismas condiciones.

Considerando estos resultados, parece ser que ninguna de las mutaciones que pudieran poseer las cepas procedentes de aislados ambientales, y que las hacen resistentes a CIP, confieren resistencia cruzada al calor. No obstante, esta afirmación podría ser errónea ya que no conocemos la termorresistencia de las cepas parentales de estas cinco cepas, que podría ser menor a la de la cepa parental utilizada en este estudio, por lo que, desde ese punto de vista, las mutaciones de las VRs a CIP sí podrían estar involucradas en un incremento de la resistencia al calor. En cualquier caso, sería conveniente ampliar el número de aislados resistentes a CIP a analizar dadas las graves implicaciones para la salud que podría suponer la aparición en la cadena alimentaria de bacterias RAM con termorresistencia elevada.

### 6.3. Identificación de las mutaciones y su impacto en la respuesta bacteriana

Las mutaciones identificadas en STVRC se muestran en la **Tabla 2** y afectan a los genes *ramR*, *cyaA* y *rpoD*.

El gen *ramR* codifica una proteína putativa que inhibe la síntesis de la proteína RamA, y mutaciones en este gen se han relacionado con pérdidas en su función represora, lo que se traduce en una mayor transcripción de la proteína (Abouzeed, Baucheron y Cloaeckaert, 2008). Por su parte, RamA está implicada en la expresión la bomba de eflujo AcrAB-tolC, clave para la resistencia a fluoroquinolonas en el género *Salmonella* (Ricci et al., 2006). La expresión de bombas de eflujo podría estar también relacionada con un descenso en la permeabilidad y fluidez de la membrana externa (Giraud et al., 2000), y, de este modo, suponer un incremento de termorresistencia (Álvarez-Ordóñez et al., 2008). Sin embargo, no es evidente el papel de *ramR* ni de AcrAB-tolC frente al estrés térmico.

El gen *cyaA* codifica el enzima adenilato ciclase, cuya función es la síntesis de cAMP (Morales et al., 2007). El cAMP es una importante señal bioquímica que, entre otras funciones, se une de manera

específica a la Proteína Receptora de cAMP (CRP), lo que provoca un cambio conformacional que define el papel del complejo cAMP-CRP como regulador de la transcripción de determinados genes (Forsman et al., 1992). Mutaciones en el gen *cyaA* que supongan la pérdida total o parcial de actividad del enzima podrían reducir la sensibilidad de *S. Typhimurium* a fluoroquinolonas. Se ha observado que la disminución de cAMP-CRP está relacionada con un incremento de la expresión de AcrAB-TolC y con la disminución de la expresión de porinas en la membrana externa. Además, parece ser que alteraciones en el complejo cAMP-CRP podrían suponer la represión de la topoisomerasa IV y hace que las células en su estado normal presenten un menor grado de super-enrollamiento del DNA, lo que limitaría la eficacia de CIP (Kary et al., 2017). Las mutaciones en el gen *cyaA* también se han relacionado con menor susceptibilidad a métodos físicos de inactivación microbiana. Existen estudios que relacionan alteraciones de cAMP-CRP con una menor sensibilidad a tratamientos de alta presión hidrostática (Vanlint et al., 2013; Gayán et al., 2020) y, en el caso concreto de los tratamientos térmicos, se ha visto que la disminución de cAMP-CRP podría estar relacionada con una mayor termorresistencia, debido a su influencia en la síntesis de la HSP DegP (Strozen, Langen y Howard, 2005).

El gen *rpoD* codifica el factor  $\sigma^D$ , el cual se une de manera específica al enzima RNA-polimerasa y está implicado en la transcripción de diversos genes constitutivos (Bang et al., 2005). Debido a que su función es esencial para la viabilidad celular, mutaciones en este gen suelen resultar letales, aunque, en algunos casos, podrían resultar beneficiosas (Hu y Gross, 1988). Mutaciones en este gen se han relacionado con mayor tolerancia a triclosán (biocida) (Gantzhorn, Olsen y Thomsen, 2015) y a APH (Gayán et al., 2020) y, por lo tanto, resulta razonable hipotetizar que *rpoD* podría estar también implicado en la resistencia a fluoroquinolonas y al tratamiento térmico. Una posible explicación es que la mutación afecte a la unión de  $\sigma^D$  a RNA-polimerasa, haciendo que otros factores sigma especializados en la respuesta al estrés y el mantenimiento de la homeostasis, como  $\sigma^H$ , tengan mayor afinidad por el enzima (Arséne, Tomoyasu y Bukau, 2000).

Todos estos resultados apuntan a que mutaciones de estos genes, o en varios de ellos, podrían estar implicados tanto en la resistencia directa a CIP como en la resistencia cruzada al calor. No obstante, serían necesarios más estudios para desentrañar el papel de cada uno de estos genes, así como sus repercusiones en la seguridad alimentaria y la salud pública.

## 7. Conclusiones

Como resultado de la realización de este Trabajo de Fin de Grado se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La variante STVRC (resistente a CIP) ha mostrado mayor resistencia al tratamiento térmico que la cepa STWT (homóloga parental), lo que indica la existencia de resistencia cruzada al calor como consecuencia de las variaciones genéticas responsables de la resistencia directa a CIP.
- Las diferencias de resistencia entre la cepa STVRC y la STWT son mayores a menor temperatura de tratamiento térmico, lo que indica que la aparición de este tipo variantes RAM en la cadena alimentaria podría comprometer en mayor medida la eficacia de tratamientos térmicos suaves, como los empleados en el cocinado de alimentos tipo *sous vide*.
- Las cinco cepas de *S. Typhimurium* aisladas de muestras ambientales, resistentes a CIP, no han mostrado diferencias significativas de termorresistencia en comparación con STWT, por lo que estos resultados, en principio, no parecen apuntar a que la mayor termorresistencia observada en la VR analizada en nuestro estudio responda a un comportamiento generalizado en las VRs de *S. Typhimurium* a CIP.
- Los genes que más probablemente podrían estar implicados en la resistencia cruzada descrita son:
  - *ramR*: gen codificante de una proteína putativa inhibidora de la transcripción de RamA, la cual podría estar implicada en la expresión de bombas de eflujo.
  - *rpoD*: gen codificante del factor  $\sigma^D$ , regulador de la transcripción de diversos genes.
  - *cyaA*: gen codificante del enzima adenilato ciclase, cuya función es la síntesis de cAMP.
- Son necesarios más estudios para identificar el papel de cada uno de los genes en la resistencia a CIP y la tolerancia al calor, así como para investigar la presencia de cepas RAM con estas características en la cadena alimentaria.

## 8. Conclusions

As a result of conducting this Degree's Final Project, the following conclusions have been reached:

- The STVRC variant (CIP-resistant) has shown greater resistance to thermal treatment than the STWT strain (parental counterpart), indicating the existence of cross-resistance to heat because of the genetic variations responsible for direct CIP resistance.
- The differences in resistance between the STVRC strain and the STWT strain are greater at lower thermal treatment temperatures, indicating that the emergence of such AMR variants in the food chain could more significantly compromise the effectiveness of mild thermal treatments, such as those used in *sous vide* cooking.
- The five strains of *S. Typhimurium* isolated from environmental samples, resistant to CIP, have not shown significant differences in thermal resistance compared to STWT. Therefore, these results, in principle, do not seem to indicate that the greater thermal resistance observed in the VR analysed in our study is a generalized behaviour in the CIP-resistant VRs of *S. Typhimurium*.
- The genes that are most likely to be involved in the described cross-resistance are:
  - *ramR*: gene encoding a putative transcriptional repressor protein of RamA, which could be involved in the expression of efflux pumps.
  - *rpoD*: gene encoding the  $\sigma^D$  factor, a regulator of the transcription of various genes.
  - *cyaA*: gene encoding the adenylate cyclase enzyme, whose function is the synthesis of cAMP.
- Further studies are needed to identify the role of each gene in CIP resistance and heat tolerance, as well as to investigate the presence of AMR strains with these characteristics in the food chain.

## 9. Valoración personal

La realización de este Trabajo de Fin de Grado ha sido una experiencia muy enriquecedora que me ha permitido ampliar mis conocimientos en el área de Microbiología, un campo que siempre me ha resultado atractivo y que considero de elevada importancia en mi formación como tecnóloga de alimentos.

La participación en este proyecto de investigación me ha permitido perfeccionar mis competencias en técnicas de análisis y aprender a interpretar los resultados obtenidos. Además, la consulta de bibliografía en inglés me ha permitido desarrollar habilidades de búsqueda y escrutinio de la información, junto con habilidades de compresión lectora en idioma extranjero. Si bien la redacción del trabajo ha supuesto todo un reto, me ha permitido mejorar mi capacidad de comunicación escrita y aprender a comunicar ideas de manera clara y organizada.

Considero que la asignatura Trabajo de Fin de Grado es de elevada relevancia dentro del plan de estudios del grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos, pues permite poner en práctica y consolidar los conocimientos adquiridos en las distintas asignaturas. Además, permite desarrollar tanto habilidades específicas como competencias transversales indispensables para nuestro futuro profesional.

No puedo dejar de mencionar el apoyo recibido por parte de mis tutores Raúl Campillo y Rafael Pagán, cuya experiencia y consejos han sido fundamentales en la realización de este proyecto. También me gustaría agradecer a mis familiares y amigos por su apoyo incondicional y, en especial, a mi amiga Ariadna por su ayuda en el diseño de la Figura 1 de este documento.

## 10. Bibliografía

- Abouzeed, Y. M., Baucheron, S. y Cloeckaert A. (2008). "RamR mutations involved in efflux mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), pp. 2428-2434. DOI: 10.1128/AAC.00084-08
- Alenazy, R. (2022). "Antibiotic resistance in *Salmonella*: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors". *Journal of King Saud University*, 34(7), art. 102275. DOI: 10.1016/j.jksus.2022.102275
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R y Bernardo, A. (2008). "Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance". *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), pp. 212 – 219. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.015
- Arnedo-Peña, A., Bellido-Blasco, J. B., Romeu-Garcia, M. A. y Meseguer-Ferrer, N. (2017). "Detection of foodborne *Salmonella* Typhimurium outbreaks". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (English ed.), 35(7), pp. 470 – 471. DOI: 10.1016/j.eimc2016.07.014
- Arsène, F., Tomoyasu, T. y Bukau, B. (2000). "The heat shock response of *Escherichia coli*". *International Journal of Food Microbiology*, 55(1), pp. 3 – 9. DOI:
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la prevención y el Control de las Enfermedades (2023). *The European Union One Health 2022 Zoonoses Report*. Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2023.8442> [Consultado 10-04-2024]
- Bang, I. S., Frye, J. G., McClelland, M., Velayudhan, J. y Fang, F. C. (2005). "Alternative sigma factor interactions in *Salmonella*:  $\sigma^E$  and  $\sigma^H$  promote antioxidant defences by enhancing  $\sigma^S$  levels". *Molecular microbiology*, 56(3), pp. 811 – 823. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04580.x
- Bearson, B. L. y Brunelle, B. W. (2015). "Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(2), pp. 201 – 204. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.04.008
- Blackburn, C. W., Curtis, L. M., Humpheson, L., Billon, C. y McClure, P. J. (1997). "Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors". *International Journal of Food Microbiology*, 38(1), pp. 31 – 44. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00085-8

Cebrián, G., Condón, S. y Mañas P. (2017). "Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics". *Foods*, 6(19), art. 107. DOI: 10.3390/foods6120107

Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S. y Mañas, P. (2007). "Heat and pulsed electric field resistance of pigmented and non-pigmented enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in exponential and stationary phase of growth". *International Journal of Food Microbiology*, 118(3), pp. 304 – 311. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.051

Centro Europeo para la prevención y el Control de las Enfermedades (2021). *EU protocol for harmonised monitoring of AMR in human Salmonella and Campylobacter isolates - Annex 1. EUCAST clinical breakpoints and epidemiological cut-off values for the priority list of antimicrobials to be tested for Salmonella enterica as of 31 August 2021*. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/antimicrobial-resistance-Salmonella-Campylobacter-harmonised-monitoring-Annex-Aug-2021.pdf> [Consultado 24-05-2024]

Chang, M. X., Zhang, J. F., Sun, Y. H., Li, R. S., Lin, X. L., Yang, L., Webber, M. A. y Jiang, H. X. (2021). "Contribution of different mechanisms to ciprofloxacin resistance in *Salmonella* spp.". *Frontiers in Microbiology*, 12(1), art. 663731. DOI: 10.3389/fmicb.2021.663731

Christaki, E., Marcou, M. y Tofarides, A. (2020). "Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence". *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), pp. 26-40. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3

Coombs, K., Rodríguez-Quijada, C., Clevenger, J. O. y Sauer-Budge, A. F. (2023). "Current understanding of potential linkages between biocide tolerance and antibiotic cross-resistance". *Microorganisms*, 11(8), art. 2000. DOI: 10.3390/microorganisms11082000

Doherty, A. M., McMahon, C. M. M. y Sheridan, J. J. (1998). "Thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates". *Journal of Food Safety*, 18(2), pp. 69 – 83. DOI: 10.1111/j.1745-4565.1998.tb00204

Douarre, P. E., Sévellec, Y., Le-Grandois, P., Soumet, C., Bridier, A. y Roussel, S. (2022). "FepR as a central genetic target in the adaptation to quaternary ammonium compounds and cross-resistance to ciprofloxacin in *Listeria monocytogenes*". *Frontiers in Microbiology*, 13(1), art. 864576. DOI: 10.3389/fmicb.2022.864576

Fellows, P. J. (2019). *Tecnología del procesado de los alimentos. Principios y práctica.* (3<sup>a</sup> ed. en español). Zaragoza: Acribia.

Forsman, K., Sondén, B., Göransson, M. y Uhlin, B. E. (1992). "Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP – cAMP receptor protein transcriptional activator". *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 89(20), pp. 9880 – 9884. DOI: 10.1073/pnas.89.20.9880

Gantzhorn, M. R., Olsen, J. E. y Thomsen, L. E. (2015). "Importance of sigma factor mutations in increased triclosan resistance in *Salmonella Typhimurium*". *BioMed Central Microbiology*, 15(1), art. 105. DOI: 10.1186/015-0444-2

Gayán, E., Van-den-Bergh, B., Michiels, J., Michiels, C. W. y Aertsen, A. (2020). "Synthetic reconstruction of extreme high hydrostatic pressure resistance in *Escherichia coli*". *Metabolic Engineering*, 62(1), pp. 287 – 297. DOI: 10.1016/j.ymben.2020.09.008

Gayán, E., Cambré, A., Michiels, C. W. y Aertsen, A. (2016). "Stress-induced evolution of heat resistance and resuscitation speed in *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888". *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), pp. 6656 – 6663. DOI: 10.1128/AEM.02027-16

Giraud, E., Cloeckaert, A., Kerboeuf, D. y Chaslus-Dancla, E. (2000). "Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(5), pp. 1223 – 1228. DOI: 10.1128/AAC.44.5.1223-1228.2000

Gómez, Y. M., Gallardo, D. I., Marchant, C., Sánchez, L. y Bourguignon, M. (2024). "An in-depth review of the Weibull model with a focus on various parameterizations". *Mathematics*, 12(1), art. 56. DOI: 10.3390/math12010056

Hassani-Zerrouk, M. (2006). *Estudio de la cinética de inactivación microbiana por el calor en condiciones no isotérmicas: aplicación a los procesos de pasteurización*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

Hu, J. C. Y Gross, C. A. (1988). "Mutations in *rpoD* that increase expression of genes in the *mal* regulon of *Escherichia coli* K-12". *Journal of Molecular Biology*, 203(1), pp. 15 – 27. DOI: 10.1016/0022-2836(88)9087-3

James, C., Dixon, R., Talbot, L., James, S. J., Williams, N. y Onarinde, B. A. (2021). "Assessing the impact of heat treatment of food on antimicrobial resistance genes and their potential uptake by other bacteria – A critical review". *Antibiotics-Basel*, 10(12), art. 1440. DOI: 10.3390/antibiotics10121440

Kampf, G. (2018). "Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in Gram-negative species". *Antibiotics-Basel*, 7(4), art. 110. DOI: 10.3390/antibiotics7040110

Kary, S. C., Yoneda, J. R. K., Olshefsky, S. C., Stewart, L. A., West, S. B. y Cameron, A. D. S. (2017). "The global regulatory Cyclic AMP Receptor Protein (CRP) controls multifactorial fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), art. e01666-17. DOI: 10.1128/AAC.01666-17

Kim, J. Y., Song, H., Kim, D. y Lee, S. Y. (2021). "Physiological changes and stress responses of heat shock treated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Food Control*, 124(1), art. 107915. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.107915

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2024). Disponible en: <https://www.genome.jp/kegg/> [Consultado 11-07-2024]

Le-Devendec, L. Jouy, E. y Kempf, I. (2018). "Evaluation of resistance gene transfer from heat-treated *Escherichia coli*". *International Journal of Food Microbiology*, 270(1), pp. 39 – 43. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.019

Mafart, P. Couvert, O., Gaillard, S. y Leguerinel, I. (2002). "On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model". *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), pp. 107 – 113. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00624-9

Mañas, P. y Pagán, R. (2005). "Microbial inactivation by new technologies of food preservation". *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), pp. 1387 – 1399. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02561.x

Mañas, P., Pagán, R., Raso, J. y Condón, S. (2003). "Predicting thermal inactivation in media of different *Salmonella* grown at different temperatures". *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), pp. 45 – 53. DOI: 10.1016/S016805(03)00049-7

Morales, C. A., Musgrove, M., Humphrey, T. J., Cates, C., Gast, R., Guard-Bouldin, J. (2007). "Phatotyping of *Salmonella enterica* by analysis of single-nucleotide polymorphisms in *cyaA* and flanking 23S ribosomal sequences". *Environmental Microbiology*, 9(4), pp. 1047 – 1059. DOI: 10.1111/j.1462-2920-2006.01233.x

Munita, J. M. y Arias, C. A. (2016). "Mechanisms of antibiotic resistance". *Microbiology Spectrum*, 4(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

National Center for Biotechnology Information (2024). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Consultado 11-07-2024]

Noor, Rashed (2015). "Mechanism to control the cell lysis and the cell survival strategy in stationary phase under heat stress". *SpringerPlus*, 4(1), art. 599. DOI: 10.1186/s40064-015-1415-7

Oguadinma, I., Mishra, A. y Kumar, G. D. (2023). "Antibiotic resistance associated lactic acid cross tolerance in Shiga-toxin producing *E. coli*". *Frontiers in Microbiology*, 14, art. 1059144. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1059144

Oliveira, A. R., Domingues, F. C. y Ferreira, S. (2017). "The influence of resveratrol adaptation on resistance to antibiotics, benzalkonium chloride, heat and acid stresses of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*". *Food control*, 73(B), pp. 1420 – 1425. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.11.011

Organización Mundial de la Salud (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health> [Consultado 24-05-2024]

Organización Mundial de la Salud (2023a)). Food Safety. Disponible en: [https://www.who.int/health-topics/food-safety/food-safety#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/food-safety/food-safety#tab=tab_1) [Consultado 10-04-2024]

Organización Mundial de la Salud (2023b). Antimicrobial resistance. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [Consultado 10-04-2024]

Organización Mundial de la Salud (2018). *Salmonella* (no tifoidea). Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typoidal)) [Consultado 29-05-2024]

Organización Mundial de la Salud (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases*. Disponible en: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1) [Consultado 04-06-2024]

Pagán, E., Merino, N., Berdejo, D., Campillo, R., Gayán, E., García-Gonzalo, D. y Pagán, R. (2023). "Adaptive evolution of *Salmonella* Typhimurium LT2 exposed to carvacrol lacks a uniform pattern". *Applied microbiology and Biotechnology*, 108(1), art. 38. DOI: 10.1007/s00253-023-12840-6

Pagán, R., Mañas, P., Raso, J y Trepaut, F. J. S. (1999). "Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media". *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2), pp. 59 – 66. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00008-2

Peleg, M. (2000). "Microbial survival curves – the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times". *Food Research International*, 33(7), pp. 531 – 538. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00088-0

Peruzy, M. F., Capuano, F., Proroga, Y. T. R., Cristiano, D., Carullo, M. R. y Murru, N. (2020). "Antimicrobial susceptibility testing for *Salmonella* serovars isolated from food samples: five-Year monitoring (2015-2019)". *Antibiotics*, 9(1), pp. 365. DOI: 10.3390/antibiotics9070365

Powell, J. K. y Young, K. D. (1991). "Lysis of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactams which bind Penicillin-Binding Proteins 1a and 1b: Inhibition by Heat Shock Proteins". *Journal of Bacteriology*, 173(3), pp. 4021 – 1026. DOI: 10.1128/jb.173.13.4021-4026.1991

Ricci, V., Tzakas, P., Buckley, A. y Piddock, A. J. V. (2006). "Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains are difficult to select in the absence of AcrB and TolC". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), pp. 38 – 42. DOI: 10.1128/AAC.50.1.38-42.2006

Sahoo, M., Panigrahi, C. y Aradwad, P. (2022). "Management strategies emphasizing advanced food processin approaches to mitigate food borne zoonotic pathogens in food system". *Food Frontiers*, 3(4), pp. 641 – 665. DOI: 10.1002/fft2.153

Siceloff, A. T., Ohta, N., Norman, K. N., Loneragan, G. H. Norby, B., Scott, H. M. y Shariat, N. W. (2021). "Antimicrobial resistance hidden within multiserovar *Salmonella* populations". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(6), art. e00048-21. DOI: 10.1128/AAC.00048-21

Singh, B. P., Ghosh, S. y Chauhan, A. (2021). "Development, dynamics and control of antimicrobial-resistant bacterial biofilms: a review". *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), pp. 1983 – 1993. DOI: 10.1007/s10311-020-01169-5.

Strozen, T. G., Langen, G. R. y Howard, S. P. (2005). "Adenylate cyclase mutations rescue the *degP* temperature-sensitive phenotype and induce the sigma E and Cpx extracytoplasmic stress regulons in *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology*, 187(18), pp. 6309 – 6316. DOI: 10.1128/JB.187.18.6309-6316.2005

Taher, E. M., Hemmatzadeh, F., Aly, S. A., Elesswy, H. A. y Petrovski, K. R. (2020). "Molecular characterization of antimicrobial resistance genes on farms and in commercial milk with emphasis on the effect of currently practiced heat treatments on viable but nonculturable formation". *Journal of Dairy Science*, 103 (11), pp. 9936 – 9945. DOI: 10.3168/jds.2020-18631

The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (2024). Disponible en: <https://card.mcmaster.ca/> [Consultado 11-07-2024]

- Vanlint, D., Pype, B. J. Y., Rutten, N., Vanoirbeek, K. G. A., Michiels, C. W. y Aertsen, A. (2013). "Loss of cAMP/CRP regulation confers extreme high hydrostatic pressure resistance in *Escherichia coli* O157:H7". *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), pp. 65- 71. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.020
- Walsh, C., Duffy, G., Sheridan, J. J., Fanning, S., Blair, I. S. y McDowell, D. A. (2005). "Thermal resistance of antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive *Salmonella* spp. on chicken meat". *Journal of Food Safety*, 25(4), pp. 288 – 302. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2005.00021.x
- Wang, Y. y Yang, H. (2022). "Metabolomics elucidating the effect of water activity on the thermal resistance of *Salmonella* in wheat flour". *Food Research International*, 162(B), art. 112203. DOI: 10.1016/j.foodrese.2022.112203
- Williamson, K. S., Dlakic, M., Akiyama, T. y Franklin, M.J. (2023). "The *Pseudomonas aeruginosa* RpoH ( $\sigma^H$ ) regulon and its role in essential cellular functions, starvation survival and antibiotic tolerance". *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), art. 1513. DOI: 10.3390/ijms24021513
- Yehia, H.M., Al-Masoud, A. H., Alarjani, K. M. y Alamri, M. S. (2020). "Prevalence of methicillin-resistant (mecA gene) and heat-resistant *Staphylococcus aureus* strains in pasteurized camel milk". *Journal of Dairy Science*, 103(7), pp. 5947 – 5963. DOI: 10.3168/jds.2019-17631