



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Estudio de la calidad microbiológica, resistencia antibiótica
y presencia de genes de resistencia a β -lactámicos
en hortalizas y fresas de cultivo ecológico.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Almudever Castro, Sara

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a: Castillo López, M^a Ángeles

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y
del Medio Natural

**ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA,
RESISTENCIA ANTIBIÓTICA Y PRESENCIA DE GENES
DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS EN HORTALIZAS Y
FRESAS DE CULTIVO ECOLÓGICO**

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología

Alumna: Sara Almudéver Castro

Tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Co-tutora: M^a Ángeles Castillo López

Valencia, Julio 2022

Estudio de la calidad microbiológica, resistencia antibiótica y presencia de genes de resistencia a β -lactámicos en hortalizas y fresas de cultivo ecológico.

Resumen

Recientemente se ha observado un auge en el consumo de hortalizas y frutas de cosecha orgánica; su consumo en crudo puede suponer un riesgo en la seguridad alimentaria para el consumidor, ya sea por su potencial patógeno o por la presencia de genes de resistencia a antibióticos, problema de gran importancia y de preferencia en las acciones de la comunidad sanitaria internacional (OMS).

En este estudio se analizaron diferentes muestras de lechuga, espinaca, col y fresas de cultivo ecológico de diferentes establecimientos de Valencia, para determinar su papel en la dispersión de bacterias resistentes a antibióticos y sus genes.

Primeramente, se estudió la calidad microbiológica de las muestras mediante indicadores de contaminación (microorganismos viables aerobios mesófilos, coliformes totales y *Escherichia coli*). Los niveles detectados de microorganismos aerobios mesófilos se sitúan por debajo de los niveles máximos lo que refleja una calidad sanitaria óptima en los productos analizados. Sin embargo, en un 35,7% de las muestras se detectaron valores elevados de coliformes totales; y en un 11,9%, de *E. coli*, lo que indica contaminación de origen fecal en las muestras.

A su vez, se aislaron bacterias pertenecientes a los principales grupos de riesgo clínico (KESC y *Acinetobacter*) sospechosos de ser resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes, antibióticos de la familia de β -lactámicos. Estos aislados fueron identificados bioquímicamente y por secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico, donde solo se encontró un 33,3% de coincidencias entre ambos métodos.

Seguidamente se determinó la sensibilidad de los aislados a distintos antimicrobianos por el método antibiograma disco-placa, detectándose un 25,6% de bacterias multirresistentes.

Para finalizar, se estudió la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY-2}*) en las muestras y en los aislados. No se detectó presencia de genes en las muestras, pero si se detectaron dos de los tres genes en un 20,03% de las cepas ensayadas.

Los resultados reflejan el riesgo que conlleva el consumo de los vegetales de hoja verde en crudo y las fresas sin lavar, ya que pueden servir de reservorio de microorganismos multirresistentes. Esto pone de manifiesto la necesidad de vigilancia epidemiológica de estos microorganismos, ya que su propagación dificultaría el tratamiento con antimicrobianos de las infecciones causadas por dichos microorganismos.

Palabras clave: análisis microbiológico, ecológico, hortalizas, fresas, viables aerobios mesófilos, coliformes, KESC, resistencia, antibióticos, β -lactámicos, antibiograma, genes.

Alumna: Sara Almudéver Castro

Tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Co-tutora: M^a Ángeles Castillo López

Valencia, Julio 2022

Estudi de la qualitat microbiològica, resistència antibiòtica i presència de gens de resistència a β -lactàmics en hortalisses i maduixes de cultiu ecològic.

Resum

Recentment s'ha observat un auge en el consum d'hortalisses i fruites de collita orgànica; el seu consum en cru pot suposar un risc en la seguretat alimentària per al consumidor, ja siga pel seu potencial patogen o per la presència de gens de resistència a antibiòtics, problema de gran importància i de preferència en les accions de la comunitat sanitària internacional (OMS).

En aquest estudi es van analitzar diferents mostres d'encisam, espinac, col i maduixes de cultiu ecològic de diferents establiments de València, per tal de determinar el seu paper en la dispersió de bacteris resistents a antibiòtics i els seus gens.

Primerament, es va estudiar la qualitat microbiològica de les mostres mitjançant indicadors de contaminació (microorganismes viables aerobis mesòfils, coliformes totals i *Escherichia coli*). Els nivells detectats de microorganismes aerobis mesòfils se situen per davall dels nivells màxims fet que reflecteix una qualitat sanitària òptima dels productes analitzats. No obstant això, en un 35,7% de les mostres es van detectar valors elevats de coliformes totals; i en un 11,9%, d' *E. coli*, la qual cosa indica contaminació d'origen fecal en les mostres.

Al seu torn, es van aïllar bacteris pertanyents als principals grups de risc clínic (KESC i *Acinetobacter*) sospitosos de ser resistents a cefalosporines de tercera generació i carbapenemes, antibiòtics de la família de β -lactàmics. Aquests aïllats van ser identificats bioquímicament i per seqüenciació del gen 16S de l'ARN ribosòmic, on només es va trobar un 33,3% de coincidències entre tots dos mètodes.

Seguidament es va determinar la sensibilitat dels aïllats a diferents antimicrobians pel mètode antibiograma disc-placa, detectant-se un 25,6% de bacteris multiresistents.

Per a finalitzar, es va estudiar la presència de gens de resistència a β -lactàmics (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY-2}*) a les mostres i en els aïllats. No es va detectar presència de gens en les mostres, però si es van detectar dos dels tres gens en un 20,03% dels ceps assajats.

Els resultats reflecteixen el risc que comporta el consum dels vegetals de fulla verda en cru i les maduixes sense llavar, ja que poden servir de reservori de microorganismes multiresistents. Això posa de manifest la necessitat de vigilància epidemiològica d'aquests microorganismes, ja que la seua propagació dificultaria el tractament amb antimicrobians de les infeccions causades per aquests microorganismes.

Paraules clau: anàlisi microbiològica, ecològic, hortalisses, maduixes, viables aerobis mesòfils, coliformes, KESC, resistència, antibiòtics, β -lactàmics, antibiograma, gens.

Alumna: Sara Almudéver Castro

Tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Co-tutora: M^a Ángeles Castillo López

Valencia, Julio 2022

Microbiological quality, antibiotic resistance, and presence of β -lactamic resistance genes in organically grown leafy vegetables and strawberries

Abstract

Recently, there has been a boom in the consumption of organically grown vegetables and fruits; their raw consumption may suppose a food safety risk to the consumer, either because of their pathogenic potential or because of the presence of antibiotic resistance genes, a problem of great importance and of preference in the actions of the international health community (WHO).

In this study, different samples of organically grown lettuce, spinach, cabbage and strawberries from different establishments in Valencia were analysed to determine their role in the spread of antibiotic resistant bacteria and their genes.

First, the microbiological quality of the samples was studied using contamination indicators (viable mesophilic aerobic microorganisms, total coliforms, and *Escherichia coli*). The levels of mesophilic aerobic microorganisms detected are below the maximum levels, which evences an optimal sanitary quality in the products analysed. However, in 35,7% of the samples, high values of total coliforms were detected; and finding in 11,9% of these samples *E. coli*, which indicates contamination of faecal origin in the samples.

Bacteria belonging to the main clinical risk groups (KESC and *Acinetobacter*) were isolated, suspicious of being resistant to third generation cephalosporins and carbapenems, antibiotics of the β -lactamic family. These isolates were identified biochemically and by 16S ribosomal RNA gene sequencing, where only 33,3% matches were found between the two methods.

The sensitivity of the isolates to different antimicrobials was then determined by the disc-plate antibiogram method, being detected 25,6% of multidrug-resistant bacteria.

Finally, the presence of β -lactam resistance genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2}) was studied in the samples and in the isolates. No genes were detected in the samples, although two of the three genes were detected in 20,03% of the isolates tested.

The results show the risk of consuming raw leafy green vegetables and unwashed strawberries as they can serve as a reservoir for multidrug-resistant microorganisms. This highlights the need for epidemiological surveillance of these micro-organisms, as their spread would hinder antimicrobial treatment of infections caused by these micro-organisms.

Keywords: microbiological analysis, organic, vegetables, strawberries, mesophilic aerobic viables, coliforms, KESC, resistance, antibiotics, β -lactamics, antibiogram, genes.

Alumna: Sara Almudéver Castro

Tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Co-tutora: M^a Ángeles Castillo López

Valencia, Julio 2022

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyarme siempre y a veces tener más claro que yo a lo que me quería dedicar, pero sobre todo por regalarme la mejor experiencia de mi vida, el Erasmus. Santi, gracias por aguantarme tanto.

A mis tutoras Ana y M^a Ángeles, por confiar en mí y tener tanta paciencia, pero sobre todo porque sois las personas de las que más he aprendido durante esta etapa.

Y por último dar las gracias a los amigos que me ha dado esta carrera, Biotekes, porque cuando parecía que no veíamos el final y la vida se nos hacía cuesta arriba, unas bravas, una cerveza y unas risas (o llantos) lo solucionaban todo.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | II |
| ÍNDICE DE TABLAS | III |
| LISTA DE ABREVIATURAS | IV |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Riesgo microbiológico | 1 |
| 1.2 Principales antibióticos y mecanismos de resistencia | 3 |
| 1.2.1 Clasificación de antibióticos basada en su mecanismo de acción | 5 |
| 1.2.2 Antibióticos β -lactámicos | 6 |
| 1.2.3 Mecanismos de resistencia antibiótica | 7 |
| 1.2.4 Transmisión de resistencias entre bacterias | 7 |
| 2. OBJETIVOS | 9 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 10 |
| 3.1 Muestras: origen y procesado..... | 10 |
| 3.2. Estudio de la calidad higiénico-sanitaria | 11 |
| 3.2.1 Recuento de viables mesófilos aerobios | 11 |
| 3.2.2 Recuento de <i>E. coli</i> y coliformes | 11 |
| 3.2.3 Lectura de los recuentos | 11 |
| 3.2.4 Análisis estadístico de los recuentos..... | 12 |
| 3.3 Aislamiento de microorganismos Gram negativos resistentes a antibióticos | 12 |
| 3.3.1 Aislamiento de microorganismos resistentes a Cefalosporinas de 3 ^a generación | 12 |
| 3.3.2 Aislamiento de microorganismos resistentes a Carbapenemes | 12 |
| 3.4. Identificación de los aislados mediante pruebas bioquímicas..... | 13 |
| 3.4.1 Pruebas previas | 13 |
| 3.4.2 Identificación mediante Tira API 20E | 13 |
| 3.4.3 Identificación de <i>Acinetobacter baumannii</i> mediante métodos moleculares | 14 |
| 3.5 Estudio de sensibilidad de los aislados a antimicrobianos..... | 15 |
| 3.6. Estudio de la presencia de genes de resistencia a antibióticos | 16 |
| 3.6.1 Extracción de ADN..... | 16 |
| 3.6.2 PCR multiplex para la detección de genes de resistencia a β -lactámicos..... | 16 |
| 3.6.3 Electroforesis en gel de agarosa | 17 |
| 4. RESULTADOS | 19 |
| 4.1 Calidad higiénico-sanitaria | 19 |
| 4.2 Identificación bioquímica de los aislados resistentes a antibióticos | 21 |
| 4.3 Identificación molecular de los aislados | 22 |
| 4.4 Sensibilidad de los aislados a antimicrobianos | 23 |
| 4.5 Genes de resistencia a β -lactámicos: <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} y <i>bla</i> _{CMY-2} | 27 |
| 5. DISCUSIÓN | 29 |
| 5.1 Calidad higiénico-sanitaria | 29 |
| 5.2 Identificación bioquímica y molecular de los aislados resistentes a antibióticos..... | 30 |
| 5.3 Sensibilidad de los aislados a los antimicrobianos..... | 31 |
| 5.4 Detección de genes de resistencia a β -lactámicos..... | 31 |
| 6. CONCLUSIONES | 33 |
| BIBLIOGRAFÍA | 34 |
| ANEXO | 38 |
| A. Recuento total de microorganismos indicadores | 38 |
| B. Resultados de la identificación molecular de aislados..... | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Evolución de la superficie ecológica certificada en la CV a lo largo de los años (CAECV, 2020) | 1 |
| Figura 2: Código de colores correspondientes a las pruebas negativas y positivas de sistema API 20E..... | 14 |
| Figura 3. Esquema del método antibiograma disco-placa para estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos. | 16 |
| Figura 4: Diagrama LSD de microorganismos viables aerobios mesófilos (UFC/g) detectados en los 4 grupos de muestras analizadas | 18 |
| Figura 5: Diagrama LSD de microorganismos coliformes (UFC/g) detectados en los 4 grupos de muestras analizadas..... | 19 |
| Figura 6: Diagrama LSD de E. coli (UFC/g) detectados en los 4 grupos de muestras analizadas | 20 |
| Figura 7: Sensibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas. | 23 |
| Figura 9: Sensibilidad a antimicrobianos en col | 24 |
| Figura 10: Sensibilidad a antimicrobianos en fresa..... | 25 |
| Figura 11: Sensibilidad a antimicrobianos en lechuga | 25 |
| Figura 12: Gel de electroforesis de la reacción de PCR para los genes bla _{TEM} , bla _{SHV} y bla _{CMY-2} .. | 26 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Muestras analizadas: tipo de vegetal, código, y fecha de toma de muestra y análisis. | 10 |
| Tabla 2. Antibióticos escogidos para estudiar la resistencia de las cepas a antimicrobianos. Clasificación por grupos. Concentración de cada antibiótico en cada disco en µg. Valores para clasificar en resistentes (R), intermedios (I) o (S) según el diámetro del halo (nm) para cada antibiótico. | 15 |
| Tabla 3. Genes de resistencia a β-lactámicos empleados en el estudio | 17 |
| Tabla 4: Identificación de las cepas aisladas mediante tiras API 20E | 20 |
| Tabla 5. Identificación molecular de los aislados sospechosos de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 21 |
| Tabla 6. Identificación molecular de todas las cepas aisladas. | 22 |
| Tabla 7. Patrones de resistencia a antibióticos en los aislados | 22 |
| Tabla 8. Genes detectados en las cepas aisladas, clasificados por vegetal, código y cepa de origen. | 26 |
| Tabla 9. Frecuencia de detección de los genes bla _{TEM} , bla _{SHV} y bla _{CMY-2} en los aislados. | 27 |
| Tabla A.1. Recuento total de los microorganismos indicadores en UFC/g: viables, coliformes totales y <i>E. coli</i> | 39 |
| Tabla B. 1. Resultados de la identificación molecular de las cepas identificadas como <i>Acinetobacter baumannii</i> por tiras API 20E | 40 |
| Tabla B. 2. Resultados de secuenciación de los aislados restantes | 41 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| ADH | Arginina deshidrolasa |
| AG | Aminoglucósidos |
| AMC | Amoxicilina |
| AMP | Ampicilina |
| AMR | Resistencia antimicrobiana |
| ARG | Genes de resistencia antibiótica |
| APT | Agua de peptona tamponada |
| CAECV | Comité de Agricultura Ecológica de la Comunidad Valenciana |
| CAZ | Ceftazidima |
| CC | Cromógeno de coliformes |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| CIP | Ciprofloxacino |
| CIT | Citrato |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CN | Gentamicina |
| CRE | Enterobacterias resistentes a carbapenemes |
| CRO | Ceftriaxona |
| CTX | Cefotaxima |
| CV | Comunidad Valenciana |
| EC | European Comission |
| ECDC | European Centers for Disease Control and Prevention |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| ESBL | Betalactamasas de espectro extendido |
| EU | European Union |
| FQ | Fluoroquinolonas |
| GEL | Gelatinasa |
| IPM | Imipenem |
| IND | Producción de indol |
| KESC | <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp |
| LEV | Levofloxacino |

| | |
|--------------|---|
| MCA | MacConckey Agar |
| MEM | Meropenem |
| MH | Mueller-Hinton Agar |
| NA | Ácido nalidíxico |
| ODC | Ornitina descarboxilasa |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBP | Proteínas de unión a penicilina |
| PCA | Plate Count agar |
| SC | Agar mSuperCARBA |
| SCF | Scientific Committee on Food |
| TDA | Triptófano desaminasa |
| TE | Tetraciclina |
| TSB | Caldo de Tripona y Soja |
| UCI | Unidad de Cuidados Intensivos |
| UFC/g | Unidades Formadoras de Colonias por gramo |
| URE | Ureasa |
| VP | Voges-Proskauer |
| WHO | Wold Health Organization |

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de hortalizas y frutas orgánicas está en pleno crecimiento, y, por tanto, también su producción. La Unión Europea define la agricultura ecológica como el sistema de producción que trata de preservar los recursos naturales y respetar el bienestar animal, a la vez que intenta aplicar los mejores métodos para respetar y conservar el medioambiente (European Commission, 2019), lo cual implica un uso de antibióticos severamente restringido, la prohibición de los plaguicidas químicos y fertilizantes sintéticos, además de los Organismos modificados genéticamente (OMG) (EU Parliament, 2018).

España se posiciona como el país europeo que más área destina a agricultura ecológica y como cuarta potencia a nivel mundial. Dentro del territorio español, la Comunidad Valenciana (CV) se sitúa como la cuarta productora del sector ecológico, experimentando un aumento en la superficie ecológica certificada de un 81,2% entre 2016 y 2020, poseyendo actualmente 146.767Ha (Figura 1). Aunque el consumo interno nacional de productos ecológicos de la CV incrementó en un 7% de 2019 a 2020, el 63% de la producción se exporta (CAECV, 2020).

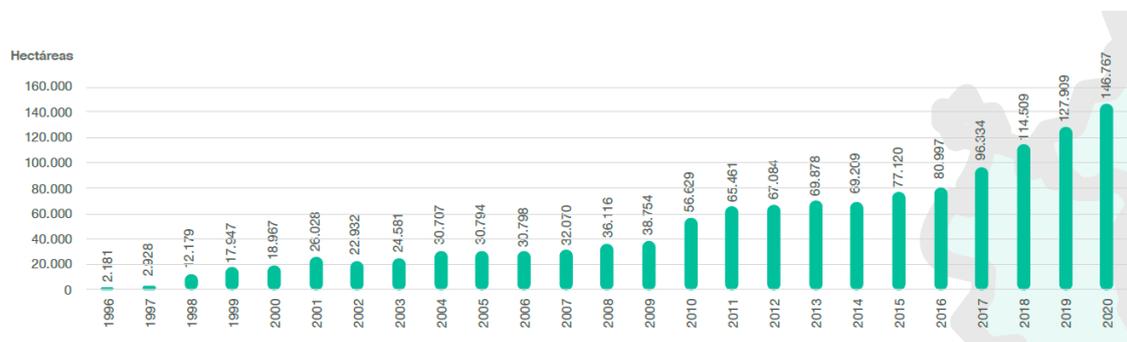


Figura 1: Evolución de la superficie ecológica certificada en la CV a lo largo de los años (CAECV, 2020)

1.1 Riesgo microbiológico

La creciente tendencia a elegir alimentos ecológicos sobre los convencionales se debe, en parte, a la creencia de que son productos libres de plaguicidas o tienen más nutrientes que los convencionales, percibiéndose como más seguros y saludables. Un metaanálisis por parte de la Universidad de Stanford (Reino Unido) llegó a la conclusión, tras analizar 237 estudios, que los productos orgánicos tenían un 30% menos de riesgo de contaminación por plaguicidas que las hortalizas y frutas de cosecha convencional, pero no estaban libres de este tipo de compuestos al 100%. Aunque los productos convencionales presenten mayor cantidad de plaguicidas, estos se situaban dentro de los límites establecidos como seguros. A nivel nutricional, no había ninguna diferencia entre ambos (Misner y Armstrong Florian, 2013).

Aunque la población cada vez está más concienciada del riesgo químico que supone el uso de los plaguicidas, no hay que descartar el riesgo por contaminación microbiológica tanto en productos orgánicos como convencionales. La calidad microbiológica y seguridad de los productos orgánicos sigue generando debate por falta de investigación y datos que permitan revelar la realidad (Magkos et al., 2006).

La idea de que estos alimentos son más seguros por no utilizar plaguicidas sintéticos ni fertilizantes químicos (Kuan et al., 2017), no es del todo cierta. De hecho, el Comité Científico de la Alimentación Humana de la UE ha levantado alertas sobre la contaminación de frutas y hortalizas a través de aguas de riego, estiércol animal, o lodos de depuradora (SCF, 2002) que pueden actuar como vehículos de transmisión de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* spp., los cuales pueden persistir mucho tiempo en el suelo.

Sin discriminar entre cultivos orgánicos o convencionales, entre 2004 y 2012 se detectaron 377 y 198 brotes asociados al consumo de verduras y frutas en Estados Unidos y la Unión Europea, respectivamente, según la base de datos de la CDC y los informes de la EFSA (CDC, 2013; EFSA, 2013). Concretamente, en la UE, el número de brotes anual osciló de los 10 a los 42, sin manifestar una tendencia clara en ese periodo de tiempo. Norovirus fue el responsable del 53% de los casos de la UE, seguido de *Salmonella* spp., que representó un 20%, y de *E. coli*, asociado con el 3,55% (Callejón et al., 2015).

La contaminación alimentaria no se puede dar solo por el método de cultivo, sino que también puede ocurrir durante la cosecha, o en la cadena de suministro de alimentos (Kuan et al., 2017). Una de las principales preocupaciones relacionadas con esta contaminación es la propagación de antibióticos en el ambiente por crear un aumento en el número de bacterias resistentes a estos (WHO, 2015). El auge en la presencia de estos microorganismos se debe a un uso excesivo de antimicrobianos en ganadería, por lo que la Comisión Europea prohibió en 2006 (EC, 2003) su uso en animales para promover su crecimiento (Pikkemaat et al., 2016). Este problema no queda restringido a ganadería, ya que los antimicrobianos utilizados son excretados y pasan a formar parte del estiércol, además de haber un contacto directo entre animales y productos alimentarios. Una vez alcanzan el suelo, entran en la cadena alimentaria y el ciclo del agua, propagándose entre los animales, las personas y el medio ambiente. Es aquí donde destaca el papel de la iniciativa 'One Health', una propuesta internacional introducida a comienzos del año 2000 que fomenta la colaboración multidisciplinar e intersectorial para lograr una salud óptima para personas, animales y medio ambiente, ya que reconoce la interconexión de estas tres. Este concepto se ha aplicado a cuestiones relacionadas con resistencia antimicrobiana o seguridad alimentaria, entre otras (EC, 2017; CDC, 2021). Aplicado a la resistencia antimicrobiana (AMR), la iniciativa 'One Health' es esencial por el uso de antimicrobianos de la misma familia y similares mecanismos de acción tanto en humanos como en animales, ya que aumenta el riesgo de transmisión de bacterias resistentes a través de la cadena alimentaria u otras vías de contacto como heces. Concretamente, el plan de acción de 'One Health' ante la resistencia antimicrobiana incluye diversas políticas que tienen como objetivo actuar contra la resistencia antimicrobiana; hacer de la UE una región de mejores prácticas; investigar, desarrollar e innovar en AMR; y mejorar la agenda global (EC, 2017).

Los métodos estándar de evaluación de la calidad microbiana en alimentos y aguas son la cuantificación de coliformes intestinales y enterococos (microorganismos indicadores de contaminación fecal), utilizada también para comprobar si existe una contaminación potencial por microorganismos patógenos. Las bacterias coliformes son gramnegativas, no formadoras de esporas, capaces de fermentar lactosa al ser incubadas a 35-57 °C, obteniendo como producto ácido y gas. Se pueden encontrar en vegetación, suelo, y agua, además de en heces de animales de sangre caliente. La presencia de estos microorganismos sugiere el deterioro de la calidad de las verduras por contaminación fecal. Aunque la mayoría de estas bacterias no son patógenas, cepas de *E. coli* como *E. coli* O157:H7 lo es, lo que contribuye a la aparición de muchos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Delaquis et al., 2007); por esta razón, la especie

E. coli también se utiliza como indicador de contaminación fecal. En los productos frescos, la mayoría de patógenos se encuentran en la superficie, pero su internalización podría producir contaminación.

La calidad higiénica también se evalúa mediante las bacterias aerobias mesófilas, que aportan información sobre la carga microbiana total, sin entrar en detalles sobre presencia de patógenos. Estas se utilizan dado que las hortalizas se cultivan en el suelo y se exponen a diferentes condiciones y peligros ambientales. Estas bacterias, como su nombre indica, proliferan en aerobiosis cuando se incuban entre 20 y 45 °C. Su presencia indica más un deterioro del alimento que una contaminación, por lo que su presencia elevada se relaciona más con la descomposición que con patogenicidad (Kuan et al., 2017).

1.2 Principales antibióticos y mecanismos de resistencia

En 1910 se utilizó por primera vez un antibiótico, el salvarsan, desarrollado por Paul Ehrlich para tratar *Treponema pallidum*, causante de la sífilis (Harhoura, 2012). Con el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming y su posterior desarrollo como fármaco gracias a Haetley, Florey, Chain y Hodgkin, empezó la Edad de Oro del descubrimiento de antibióticos (1940 a 1970), alcanzando su pico a mediados de los 50. Los antibióticos son medicamentos de origen natural o sintético utilizados para combatir infecciones causadas por bacterias, matándolas o dificultando su crecimiento y multiplicación (CDC, 2021). Los antibióticos no solo han permitido el tratamiento de enfermedades infecciosas, sino también hacen posible la realización de procedimientos médicos, como operaciones a corazón abierto. En resumidas cuentas, la introducción de los antibióticos en clínica supuso el mayor avance médico del siglo XX (Katz y Baltz, 2016).

A finales de 1930, y a raíz del descubrimiento de los antibióticos, Waksman inició un estudio sobre la producción de compuestos antimicrobianos por parte de los microorganismos que le llevó a definir estos como “compuestos producidos por un microbio para destruir otros microbios”, además de identificar *Actinomyces* filamentosos, encontrados en el suelo como superproductores. En ellos descubrió la producción de neomicina o estreptomycin, destacado por ser el primer antibiótico utilizado para tratar la tuberculosis (Waksman et al., 2010). Su trabajo llevó a proclamar al género *Streptomyces* como principal productor de antimicrobianos de origen natural, representando un 64% de los mismos, además de llegar a utilizar como anticancerígenos e inmunosupresores (Newman y Cragg, 2016).

El descubrimiento de la penicilina, el trabajo de Waksman y la consecuente Edad de Oro del descubrimiento de antibióticos no han sido suficientes para frenar a los patógenos, ya que, su excesivo uso ha llevado a la aparición de bacterias resistentes a los antimicrobianos, que ha resultado en infecciones intratables. Esto ha llevado al resurgimiento del interés en desarrollar nuevos fármacos (Hagen-Zanker et al., 2011), la mayoría derivados de clases conocidas o antibióticos sintéticos. Sin embargo, el éxito en la introducción de los antibióticos sintéticos en clínica es más bien escaso (FAO, 2009), por lo que se ha focalizado parte de la investigación en descubrir antibióticos naturales.

Un microorganismo resistente a un antibiótico es aquel que puede persistir o multiplicarse en presencia de una cantidad elevada de dicho agente antimicrobiano si se compara con la administrada a un microorganismo susceptible de la misma especie (Ashbolt et al., 2013). Entre estos encontramos enterobacterias resistentes a carbapenemes, como *Klebsiella pneumoniae* y

E. coli, que suponen una amenaza a pacientes y al sistema sanitario de la Unión Europea. Las bacterias pertenecientes a la familia de las Enterobacterias (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., y *Morganella* spp.) son parte de la microbiota intestinal humana, sin embargo, son una de las principales causantes de las infecciones comunitarias asociadas al tracto urinario, respiratorio, o al torrente sanguíneo (ECDC, 2019). Desde los inicios del s. XXI, la propagación de *E. coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) capaz de hidrolizar casi todos los antibióticos betalactámicos ha provocado un aumento en la administración de carbapenémicos, siendo esos los que no pueden ser hidrolizados. Estos agentes son esenciales en el tratamiento de infecciones nosocomiales, especialmente aquellas relacionadas con trasplantes o hospitalizaciones en UCI (Nordmann et al., 2012). La rápida propagación de ESBLs junto con la predisposición de estas bacterias a adquirir genes de resistencia, ha hecho que se detecten, primero en *K. pneumoniae*, y después en *E. coli*, resistencias a penicilinas y cefalosporinas (ECDC, 2019).

Los carbapenemes suelen ser los agentes seleccionados para tratar las infecciones por enterobacterias multirresistentes en pacientes hospitalizados, pero desde 1990 no han cesado los informes sobre resistencias a estos (ECDC, 2019). Este fenómeno ha traído consigo un elevado porcentaje de mortalidad asociado a los pacientes con infecciones severas por enterobacterias resistentes a carbapenemes (CRE), cuyo rango se encuentra entre el 30% y el 75% (Tischendorf et al., 2016). La mortalidad por infecciones del torrente sanguíneo causadas por CRE se encuentra por encima del 50%; las infecciones del torrente sanguíneo o neumonías causadas por *K. pneumoniae*, tienen un porcentaje de mortalidad de un 27% (Hauck et al., 2016).

En estas infecciones por CRE, el ambiente hospitalario juega un papel clave, ya que se ha visto que actúa como reservorio de CRE, siendo fuente de varios brotes. De hecho, mediante métodos epidemiológicos genómicos se ha demostrado que los hospitales son reservorios de una variedad de bacterias que presentan plásmidos que confieren resistencia a carbapenemes, pudiendo ser transferidos a diferentes enterobacterias (ECDC, 2019). Dejando de lado la mortalidad, también hay que mencionar que las infecciones por CRE han provocado un aumento de costes a los sistemas sanitarios, ya que prolongan las estancias hospitalarias, siendo causantes de infecciones nosocomiales (Tischendorf et al., 2016).

Estos problemas han llevado a la OMS a elaborar una lista de prioridad global de bacterias resistentes a antibióticos, que tiene como objetivo guiar la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos. Según la especie y el tipo de resistencia, los patógenos han sido agrupados en tres grupos de prioridad: crítica, alta, y media (WHO, 2017). En el grupo de prioridad crítica encontramos *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes y *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemes y cefalosporinas de tercera generación. En prioridad alta encontramos *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y vancomicina, *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina, *Campylobacter* y *Salmonella* spp. resistentes a fluoroquinolonas y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas. En el último grupo, de prioridad media, se encuentra *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y *Shigella* spp. resistente a fluoroquinolonas. En su mayoría, estas bacterias han pasado a ser consideradas patógenas por presentar resistencias a β -lactámicos (donde se incluyen carbapenémicos) y quinolonas siendo los genes más relevantes en cuanto a otorgar resistencia *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{OXA-48/181}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} (Iredell et al., 2016).

1.2.1 Clasificación de antibióticos basada en su mecanismo de acción

Antibióticos dirigidos a la pared celular

La pared celular bacteriana está formada por peptidoglicano, cuyas hebras de glicano se entrecruzan gracias a la acción de las transglucosidasas, provocando que se creen enlaces cruzados entre péptidos de las diferentes cadenas peptídicas. Estas cadenas presentan la porción de D-alanil-alanina, que queda entrecruzada por residuos de glicina, cuando las proteínas de unión a penicilina están presentes. Los antibióticos de este grupo provocan la inhibición de la síntesis de la pared celular (Kapoor et al., 2017). Las bacterias gramnegativas, al tener una menor capa de peptidoglucano, se ven perjudicadas más rápidamente que las grampositivas.

- *Antibióticos betalactámicos.* El objetivo de los antibióticos de este grupo es atacar las proteínas de unión a penicilina (PBP). Se caracterizan por poseer un anillo β -lactámico, que simulan la subunidad de D-alanil D-alanina que se une normalmente a estas proteínas de unión a penicilina para evitar su unión, y consecuentemente, síntesis de nuevos peptidoglicanos, lo que desemboca en lisis (Džidić et al., 2008). En este grupo encontramos la amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y los carbapenemes imipenem y meropenem.
- *Glucopéptidos.* Estos se unen a la porción de D-alanil D-alanina de la cadena lateral peptídica de la subunidad precursora de peptidoglucano. La unión de esta con la proteína de unión a penicilina es bloqueada por la vancomicina, inhibiéndose la síntesis de la pared celular (Džidić et al., 2008).

Inhibidores de la biosíntesis de proteínas

Los antimicrobianos de este grupo se dividen según si inhiben la biosíntesis de proteínas al atacar la subunidad 30S o 50S del ribosoma.

- *Inhibidores de la subunidad 30S.* Aminoglucósidos (AG). Los AG dan lugar a la formación de poros grandes que permiten la entrada del antibiótico en la bacteria. Su principal objetivo es el ribosoma, concretamente, la interacción con el ARNr 16S de la subunidad 30S por los puentes de hidrógeno, cerca del sitio A. Este grupo de antimicrobianos actúa en sinergia con los de inhibición de síntesis de la pared celular, ya que estos permiten que haga falta una mejor dosis de AG, además de facilitar su entrada (Kapoor et al., 2017). Un ejemplo de aminoglucósido sería la gentamicina. En este grupo encontramos las tetraciclinas, como la tetraciclina, que, en este caso, evita la unión del ARNr al sitio A por su unión a las regiones conservadas del ARNr 16S (Yoneyama, 2006).
- *Inhibidores de la subunidad 50S.* Se pueden distinguir tres tipos, cloranfenicol, macrólidos y oxazolidinonas, que se unen al ARNr 23S de la subunidad 50S, causando un impedimento en la síntesis de proteínas.

Inhibidores de la replicación del ADN: quinolonas

La enzima ADN girasa se encarga de introducir superenrollamientos negativos, cortando el ADN de doble cadena y volviéndolo a unir, permitiendo que los superenrollamientos positivos no inhiban la replicación y transcripción. Esta enzima está formada por dos subunidades: la B, que

introduce los superenrollamientos negativos, y la A, que une de nuevo las hebras que habían sido cortadas. Su función es inhibida por la acción de las fluoroquinolonas (FQ) por su unión a la subunidad A, por lo que el ADN no puede ser replicado ni transcrito (Kapoor et al., 2017). Ejemplos de quinolonas son levofloxacin, ciprofloxacino y ácido nalidíxico.

Inhibidores del metabolismo del ácido fólico: sulfonamidas y trimetoprima.

Estos dos antimicrobianos actúan en diferentes niveles de la misma ruta, el metabolismo del ácido fólico, pudiendo actuar en sinergia (Yoneyama, 2006).

1.2.2 Antibióticos β -lactámicos

Como se ha mencionado anteriormente, los antibióticos betalactámicos actúan sobre la pared celular, inhibiendo la síntesis de esta por actuar sobre las PBP. Sin embargo, encontramos diferentes clases dentro de este grupo, siendo el punto de unión el anillo β -lactámico.

Penicilinas. Las penicilinas derivan de *Penicillium*, sensibles al ácido clavulánico. Se pueden clasificar en diferentes grupos: penicilinas naturales que incluye a la penicilina G que actúa ante bacterias aerobias grampositivas y anaerobias; las aminopenicilinas semisintéticas, que incluyen a la amoxicilina y su espectro antibacteriano son las bacterias aerobias grampositivas y anaerobias, aunque puede haber alguna gramnegativa susceptible; penicilinas resistentes a penicilinasas como la oxacilina cuya diana son las bacterias aerobias grampositivas productoras de β -lactamasas susceptibles y carboxipenicilinas de espectro extendido como la carbenicilina, los cuales presentan mayor actividad contra aerobios gramnegativos susceptibles como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella* spp. (Sykes, 2014). Dos β -lactamasas comúnmente encontradas en miembros de Enterobacteriaceae son TEM-1 y SHV-1, unas penicilinasas con poca o ninguna actividad contra las cefalosporinas (Kapoor et al., 2017).

Cefalosporinas. Existen hasta cinco generaciones de cefalosporinas, que derivaron en un principio de *Acremonium* spp. Estas cinco generaciones disciernen en el espectro de actividad, que aumenta según la generación. Estos antibióticos son resistentes a lactamasa β -estafilocócica y β -lactamasas gramnegativas. Sin embargo, incluso las cefalosporinas de tercera generación pueden ser hidrolizadas por las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Sykes, 2014). Las cefalosporinas de primera generación tienen una amplia actividad contra la mayoría de cocos grampositivos y una mínima contra bacterias gramnegativas. Las cefalosporinas de segunda generación tienen una cobertura ampliada contra las especies *Bacteroides*, menos actividad contra los cocos grampositivos, y mayor actividad contra bacilos gramnegativos; además de actuar frente a *H. influenzae*, *Enterobacter aerogenes*, *Neisseria* spp., y *Serratia marcescens*, en comparación con la primera generación. Los antibióticos ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima se encuentran dentro de las cefalosporinas de tercera generación, que tienen principalmente actividad contra bacterias gramnegativas, y son utilizadas generalmente para tratar infecciones provocadas por bacterias gramnegativas resistentes a las cefalosporinas de las dos primeras generaciones. La cuarta generación incluye antimicrobianos que pueden alcanzar el fluido cerebroespinal y cobertura contra bacilos gramnegativos productores de β -lactamasas. La quinta generación incluye un antibiótico de amplio espectro, ceftarolina, que actúa ante bacterias gramnegativas y grampositivas, y que se diferencia de las otras generaciones por su acción ante *S. aureus* resistente a meticilina (Bui y Preuss, 2021).

Monobactámicos. Solo existe un antibiótico de esta clase de betalactámicos, el aztreonam, cuya actividad está dirigida hacia bacterias Gram negativas, siendo poco exitosa contra cepas de *Enterobacter* o *Acinetobacter*.

Carbapenémicos. La aplicación de esta clase de antibióticos provoca una lisis celular más rápida de un amplio espectro de bacterias. Esto se debe a que atraviesan de forma más eficaz la membrana externa de bacterias gramnegativas y se unen a una variedad de PBP que conduce a esta lisis. Pertenecen a este grupo imipenem y meropenem, y son resistentes a casi todas las β -lactamasas bacterianas. El uso de estos antibióticos suele estar restringido al tratamiento de infecciones gramnegativas graves multirresistentes, principalmente las causadas por *K. pneumoniae*, *E. coli* o *P. aeruginosa* (Sykes, 2014).

1.2.3 Mecanismos de resistencia antibiótica

Los microorganismos ponen en marcha diversos mecanismos que previenen que los antimicrobianos se acumulen, ya sea disminuyendo la captación de estos o aumentando su salida de las células.

Canales de porina. Estos se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, y permiten el paso de moléculas pequeñas hidrofílicas, como los betalactámicos y quinolonas. Una reducción del número de estos canales hace que puedan penetrar menos antibióticos betalactámicos y fluoroquinolonas, creando una resistencia a estos. Además, una baja permeabilidad de la membrana externa provoca la resistencia adquirida a todas las clases de antibióticos, hecho que ocurre en *Pseudomonas aeruginosa* (Kapoor et al., 2017).

Bombas de flujo. Son las proteínas de membrana, concretamente de membrana citoplasmática, encargadas de expulsar al exterior el antibiótico que ha entrado en la célula, para mantener unas concentraciones mínimas en el interior. Todos los antibióticos son susceptibles de su acción, a excepción de polimixina. Aunque puede haber bombas de flujo específicas de familia, también existen generales, lo que puede desencadenar en la aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos (Kapoor et al., 2017).

Modificación de la molécula diana. La unión del antibiótico a su molécula diana es una interacción muy específica comúnmente, por lo que una mínima alteración de esta diana puede impedirla. Esta modificación suele ser resultado de una modificación espontánea de un gen bacteriano.

1.2.4 Transmisión de resistencias entre bacterias

Los elementos genéticos que codifican para la resistencia antibiótica pueden estar localizados cromosómicamente o extracromosómicamente, estando asociados a elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones, cassettes o transposones, permitiendo la transferencia horizontal y vertical de genes (Ashbolt et al., 2013). Una vez un gen de resistencia antibiótica se manifiesta en una bacteria, se puede propagar a otras especies bacterianas (Alexander et al., 2016). Esta transferencia horizontal de genes se da por tres mecanismos: transformación, transducción y conjugación.

Transformación. El ADN desnudo que se encuentra en el medio puede ser absorbido por bacterias competentes, siendo posteriormente insertado en su genoma. Si hay presencia de péptidos inductores de competencia o inanición de nutrientes, se puede adoptar este estado competente (Chen y Dubnau, 2004). Patógenos de esta naturaleza y que adoptan genes de resistencia antibiótica (ARG) mediante estos mecanismos son *Neisseria gonorrhoeae* o *Streptococcus pneumoniae*. Esta transformación también se puede dar por fusión de vesículas de membrana, esferas de 20 a 250 nm producidas por bacterias Gram negativas, llevando el

material genético en su interior hacia otras bacterias. Se ha informado de que *E. coli* y el género *Acinetobacter* utilizan este mecanismo (McInnes et al., 2020).

Transducción. Mediante un agente viral, un bacteriófago, que actúa como intermediario, se puede transferir ADN cromosómico y extracromosómico de una bacteria donante a una receptora. Los bacteriófagos pueden movilizar cualquier fragmento del genoma de la célula que han infectado (Chiang et al., 2019). Sin embargo, la contribución cuantitativa de estos agentes a la transferencia horizontal de ARG aún no se conoce bien (McInnes et al., 2020).

Conjugación. Este método se sostiene por los elementos genéticos móviles, como los plásmidos, que se pueden transferir entre célula donante y receptora por un *pilus*. Al existir un contacto físico, requiere de más etapas y más complejas (Cabezón et al., 2015). Los plásmidos conjugativos son probablemente los más relevantes en la transferencia horizontal de ARG, ya que por su tamaño (90kbp) pueden transportar múltiples genes de resistencia. Este tamaño permite, no solo transferir ARG, sino también elementos que permiten codificar nuevas rutas metabólicas o tolerancia a desinfectantes o metales pesados (McInnes et al., 2020).

Aunque estos genes de resistencia sean detectados mediante métodos moleculares, existe la posibilidad de que se manifieste una incongruencia entre el genotipo y el fenotipo. Esto puede deberse a que el gen no esté expresado, haya mutado a una forma no funcional, el gen esté presente en ADN extracelular, o esté incompleto (Luby et al., 2016).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es evaluar la calidad microbiológica de hortalizas y fresas de cultivo ecológico de los comercios de Valencia, y su papel como vehículos de transmisión de microorganismos resistentes a antibióticos y genes de resistencia a antibióticos. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el estado higiénico-sanitario mediante la detección y cuantificación de diferentes familias de microorganismos indicadores (Viables Mesófilos aerobios, coliformes y *E. coli*).
2. Aislar bacterias del grupo KESC (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp.) y *Acinetobacter* spp. sospechosas de ser resistentes a carbapenemes y cefalosporinas de tercera generación.
3. Estudiar la sensibilidad de los aislados a antimicrobianos de 4 familias (β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos) y detectar la presencia de multirresistencias.
4. Detectar genes de resistencia a β -lactámicos tanto en muestras como en aislados (*bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}).
5. Comparar métodos de identificación microbiana bioquímicos y moleculares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras: origen y procesado

Se han analizado un total de 42 muestras de vegetales de cultivo ecológico, procedentes de 19 establecimientos situados en la ciudad de Valencia: 3 de lechuga, 2 de lechuga roble, 8 de espinaca, 10 de col lombarda, 7 de col repollo, 1 de col rizada y 11 de fresa.

Los muestreos se realizaron semanalmente durante el periodo comprendido entre octubre de 2021 y marzo de 2022. Se obtuvieron entre tres y cuatro unidades de cada vegetal y 750 g de fresa para poder hacer una muestra más homogénea. Los establecimientos de compra se fueron alternando junto con los proveedores para tener una muestra más amplia.

Tabla 1. Muestras analizadas: tipo de vegetal, código, y fecha de toma de muestra y análisis

| Vegetal | Código muestra | Fecha |
|---------------|-------------------------|-------------------|
| Lechuga | EF59, EF61 | octubre de 2021 |
| | EF81 | enero de 2022 |
| Lechuga roble | EF62 | octubre de 2021 |
| | EF89 | febrero de 2022 |
| Espinaca | EF58 | octubre de 2021 |
| | EF66, EF69, EF72 | noviembre de 2021 |
| | EF75 | diciembre de 2021 |
| | EF83 | enero de 2022 |
| Col lombarda | EF86, EF92 | febrero de 2022 |
| | EF65, EF67, EF71, EF74 | noviembre de 2021 |
| | EF76 | diciembre de 2021 |
| | EF78, EF84 | enero de 2022 |
| Col repollo | EF93, EF95 | febrero de 2022 |
| | EF98 | marzo de 2022 |
| | EF64, EF68, EF70, EF73 | noviembre de 2021 |
| | EF77 | enero de 2022 |
| Col rizada | EF90 | febrero de 2022 |
| | EF97 | marzo de 2022 |
| | EF87 | febrero de 2022 |
| Fresa | EF60 | octubre de 2021 |
| | EF63 | noviembre de 2021 |
| | EF79*, EF80, EF82, EF85 | enero de 2022 |
| | EF88, EF91, EF94, EF96 | febrero de 2022 |
| | EF99 | marzo de 2022 |

*Muestra de cultivo convencional

El procesado constó de dos partes para las cuales, se cortaron y homogenizaron, en condiciones de asepsia en cabina de flujo, las cantidades requeridas de cada vegetal según la Norma ISO 6887-1:2017 sobre la preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Estas cantidades fueron de 25 g, 10 g y 10 g por muestra, suficiente para que la muestra sea representativa de todas las partes del vegetal. En las muestras de fresa se eliminó el pedículo y los sépalos, es decir, solo se utilizó la parte comestible.

3.2. Estudio de la calidad higiénico-sanitaria

Para el estudio de la calidad higiénico-sanitaria se tomaron 25 g del vegetal a los que se le añadió 225 mL de Agua de Peptona Tamponada (APT) (Scharlau, Barcelona, Spain) estéril, la mezcla fue homogenizada durante 5 minutos en el Stomacher (BAGPAGE, Interscience, BagSystem), con lo que se obtuvo la primera dilución (10^{-1}). Se realizaron diluciones decimales seriadas según se describe en la Norma ISO 6887-1:2017 hasta obtener tantas como se consideró necesario según la carga microbiana estimada en cada vegetal. A partir de esta primera dilución también se separaron 50 mL y se introdujeron en un Falcon estéril, el cual se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para una posterior extracción de ADN e identificación directa de genes de resistencia a β -lactámicos.

3.2.1 Recuento de viables mesófilos aerobios

Para poder aislar y realizar el recuento de los microorganismos viables mesófilos, se sembró la muestra en profundidad con agar Plate Count (PCA) (PLATE COUNT AGAR, Scharlau, Barcelona, Spain), por duplicado siguiendo la Norma ISO 4833-1:2013. Para ello, se vertió 1 mL de las diferentes diluciones seriadas sobre placas vacías, y se añadió posteriormente PCA, tras una agitación suave, las placas se incubaron a $28 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $48 \pm 1\text{ h}$.

3.2.2 Recuento de *E. coli* y coliformes

Para poder aislar y realizar el recuento de *E. coli* y coliformes, se inocularon 0,1 mL de las diferentes diluciones seriadas en placas con medio de cultivo Cromógeno de Coliformes (CC) (CHROMOGENIC COLIFORMS AGAR BASE, Scharlau, Microinstant®, Barcelona, Spain), en superficie y por duplicado, y se incubaron a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24 \pm 1\text{ h}$, basándose en la norma UNE-EN ISO 9308-1:2014 para evaluar la calidad del agua.

3.2.3 Lectura de los recuentos

Una vez incubadas las placas a la temperatura y el tiempo indicados para cada uno de los microorganismos estudiados, se procedió a la lectura de estas siguiendo la Norma ISO 7218 relativa a las reglas generales para los exámenes microbiológicos por el que se define el cálculo y la expresión de los resultados. Para el recuento se utilizó el Colony Counter (Digital S, P Selecta) que permite, mediante la lupa incorporada, una correcta visualización y conteo de todas las colonias presentes. Se seleccionaron aquellas placas que contuvieran de 30 a 300 colonias para que fuera estadísticamente significativo

El uso de Cromógeno de Coliformes (CC) (CHROMOGENIC COLIFORMS AGAR BASE, Scharlau, Microinstant®, Barcelona, Spain) nos permitió detectar bacterias coliformes y *E. coli*. Esto se deba a la presencia de Salmon-GAL (6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) y X-glucuronido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronido), dos sustratos cromógenos. Las bacterias coliformes presentan el enzima β -D-galactosidasa, que escinde Salmon-GAL produciendo colonias rosas. *E. coli*, además de contener este enzima, también presenta el enzima β -D-glucuronidasa, que escinde X-glucuronido, produciendo colonias azules.

Esta diferenciación entre colonias hizo posible un recuento diferencial y total. Se contaron las dos placas de la dilución seleccionada y se calcularon las Unidades Formadoras de Colonias por gramo (U.F.C/g) utilizándose la Ecuación 1, sabiendo que d corresponde a la dilución y $p1$ y $p2$ a las colonias contadas en cada placa.

$$U.F.C/g = \frac{p1 + p2}{2} \times d^{-1}$$

Ec. 1

Seguidamente se realizó la lectura de viables mesófilos aerobios, llevándose a cabo un recuento sobre todas las colonias crecidas en PCA en profundidad. Se contaron las dos placas de la dilución seleccionada y se calcularon las Unidades Formadoras de Colonias por gramo (U.F.C/g) utilizándose la Ecuación 2, sabiendo que d corresponde a la dilución y $p1$ y $p2$ a las colonias contadas en cada placa.

$$U.F.C/g = \frac{p1 + p2}{2} \times d^{-1} \times 10$$

Ec. 2

3.2.4 Análisis estadístico de los recuentos

Los resultados de los recuentos se analizaron mediante el programa SATGRAPHICS Centurion XVIII (<https://statgraphics.net/>). Para el análisis se agruparon los resultados por los cuatro tipos de muestras principales (lechuga, espinaca, col y fresa), y se realizó una prueba LSD.

3.3 Aislamiento de microorganismos Gram negativos resistentes a antibióticos

3.3.1 Aislamiento de microorganismos resistentes a cefalosporinas de 3ª generación

Con el fin de seleccionar microorganismos resistentes a cefalosporinas de 3ª generación se preparó APT suplementada con cefotaxima (CTX) a una concentración de 2,5 mg/L, y vancomicina a 5 mg/L; este último con el fin de inhibir a las bacterias Gram positivas (Liu et al., 2018).

Seguidamente se tomaron 10 g de muestra sobre los que se adicionó 90 mL del APT, con antibióticos. Tras su homogenización en Stomacher (BAGPAGE, Interscience, BagSystem) durante 5 minutos aproximadamente, los caldos se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 1 h. Pasado este tiempo, se sembraron mediante triple estría en agar MacConkey (MCA) (MacCONKEY AGAR, Scharlau, Microinstant, Barcelona, Spain) suplementado con CTX a una concentración de 2,5 mg/L y VAN a 5 mg/L, para aislar bacterias Gram negativas resistentes a cefotaxima, principalmente enterobacterias. Se seleccionaron aquellas colonias de color rojo-púrpura, presuntas *E. coli* y las incoloras presumiblemente pertenecientes a *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, según indicaciones del fabricante.

Por cada muestra, se seleccionaron, de forma aleatoria, 5 colonias crecidas en agar MacConkey, sembrándose por triple estría en PCA (37 ± 1 °C, 24 h) resembrando tantas veces sea necesario hasta la obtención de cultivos puros.

Asimismo, a partir del APT incubada se tomaron 50 mL en un Falcon estéril, el cual se almacenó a -20 °C para una posterior extracción de ADN e identificación directa de genes de resistencia a β -lactámicos.

3.3.2 Aislamiento de microorganismos resistentes a carbapenemes

Con el fin de aislar microorganismos resistentes a carbapenemes se preparó de forma paralela recipientes con 90 mL de Caldo de Triptona y Soja (TSB) (TRYPTIC SOY BROTH, Eur. Pharm., Scharlau, Barcelona, Spain), suplementado con meropenem (MEM) 1 mg/L, y vancomicina (VAN) 8 mg/L, que se adicionaron a 10 g de muestra. Tras su homogenización en Stomacher durante 5 minutos aproximadamente, se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 ± 1 h. Pasado este tiempo, las muestras se sembraron por triple estría en placas con agar mSuperCARBA (SC) (CHROMagar™ mSuperCARBA™, Paris, France), para aislar bacterias Gram negativas resistentes a carbapenemes. Según las indicaciones del fabricante, las colonias crecidas en este medio se diferencian por colores, identificándose *E. coli* por su color rosa, otras enterobacterias (*Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.) por su color azul-verdoso y *Acinetobacter* spp. por su color claro y opaco.

Por cada muestra, se seleccionaron, de forma aleatoria, 5 colonias crecidas en agar mSuperCARBA, sembrándose por triple estría en PCA (37 ± 1 °C, 24 h) resembrando tantas veces sea necesario hasta la obtención de cultivos puros.

Además, 50 mL del caldo TSB incubado se almacenaron a -20°C para una posterior extracción de ADN e identificación de genes de resistencia.

3.4. Identificación de los aislados mediante pruebas bioquímicas

Una vez crecieron los cultivos puros en PCA, se procedió con diferentes pruebas bioquímicas para identificar y seleccionar aquellos microorganismos sospechosos según los criterios anteriormente establecidos.

3.4.1 Pruebas previas

La primera de las pruebas a realizar es la **prueba de la oxidasa**, es decir, si los aislados presentan o no el sistema citocromo-oxidasa. Para ello, se utilizaron unas tiras reactivas de oxidasa (OXIDASE Reagent, Scharlau, Barcelona, Spain), que se aplicaron directamente sobre el cultivo. El funcionamiento de estas tiras se basa en la presencia del reactivo NNN'N', tetrametil,1-4, fenilendiamina, que al entrar en contacto con el cultivo vira a morado si este es oxidasa positivo. Tras esta primera prueba bioquímica, se seleccionaron solamente las cepas resultantes de ser oxidasa negativo.

Posteriormente se realizó la **prueba de la catalasa**. Se deposita una colonia aislada sobre una gota de H₂O₂, resultando positivo si se produce burbujeo en menos de 1 minuto. Esta reacción es producida por la presencia de catalasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, y que se encuentra habitualmente en bacterias aerobias. Tras esta prueba, se seleccionaron aquellas cepas resultantes de ser catalasas positivas.

Se siguió con el análisis mediante una tinción Gram. El objetivo era poder identificar aquellos microorganismos Gram negativos, ya que los microorganismos investigados en el presente trabajo presentan esta característica.

3.4.2 Identificación mediante Tira API 20E

Todas aquellas cepas resultantes de ser oxidasa negativa, catalasa positiva y Gram negativa se identificaron mediante las **pruebas bioquímicas miniaturizadas API 20E** (Tiras API, Biomèrieux, Spain), Para la identificación por el sistema API 20E se partió de un cultivo puro de 24 horas, de donde se seleccionó una colonia aislada que se resuspendió en 5 mL de agua estéril.

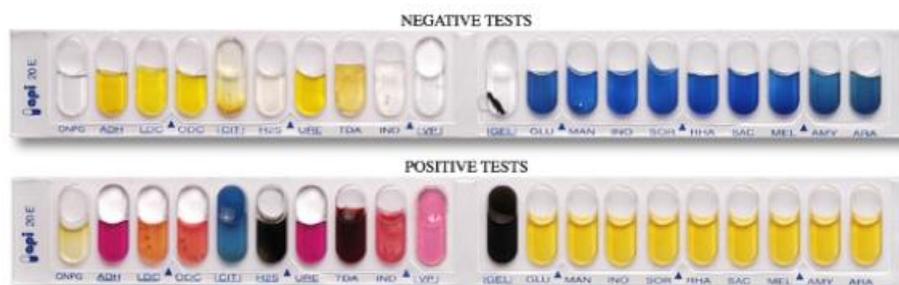


Figura 2: Código de colores correspondientes a las pruebas negativas y positivas de sistema API 20E

Con este inóculo se llenaron los 20 microtubos del sistema, llenándose por completo aquellas pruebas indicadas (CIT, VP, GEL) y con vaselina las cúpulas de las pruebas que requerían un ambiente anaerobio (ADH, ODC, H₂S, URE), una vez inoculada se incubó a 37 ± 1 °C, 24 h. Pasado ese tiempo, se adicionaron los reactivos pertinentes en las pruebas de IND, VP y TDA. Se introdujeron los resultados obtenidos (Figura 2) de las 20 pruebas, además del resultado de la prueba oxidasa, en la herramienta informática APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com>) obteniéndose la identificación del aislado.

Todos los aislados identificados fueron almacenados a -20 °C en crioviales (Microbank, Prolab Diagnostics™, Thermo Fischer Scientific, UK), para análisis posteriores.

3.4.3 Identificación de *Acinetobacter baumannii* mediante métodos moleculares

La identificación mediante las pruebas miniaturizadas API 20E (Tiras API, Biomèrieux, Spain), es óptima para la identificación de enterobacterias, encontrándose resultados con un porcentaje de identificación aceptable. En el caso de *Acinetobacter baumannii*, al no ser específica la tira empleada y al obtener resultados muy dispares de identificación se procedió a una identificación mediante amplificación y secuenciación del 16S ARNr para todas las cepas sospechosas de ser dicha especie.

Para ello, se extrajo el ADN mediante el protocolo explicado en el punto 3.6 y se realizaron dos PCR cuyo volumen final era de 25 µL para obtener suficiente producto de amplificación requerido para la secuenciación, de los cuales 2,5 µL correspondían al ADN extraído y los 22,5 µL restantes al mix de reacción. Este mix de reacción consistía en buffer PCR 1X, 2 mmol de MgCl₂ 200 µmol de cada dNTP, 0,4 µmol de cada cebador utilizado y 1,25 U de BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline), y agua miliQ estéril hasta completar los 25 µL de mix. Los cebadores empleados para la amplificación fueron 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), específicos para las cepas de *E. coli* (Cherif-Antar et al., 2016), incluyendo la identificación de otras enterobacterias.

Las condiciones del termociclador para esta PCR fueron las descritas en (Lane, 1991): 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos de amplificación compuestos por 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C, y 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Posteriormente, se purificaron los productos de la PCR para obtener solamente los fragmentos de ADN amplificados, eliminando así los componentes del mix de reacción y que la secuenciación se pudiera llevar a cabo correctamente. Se utilizó el kit para purificar los productos de PCR (GenElute PCR Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), siguiéndose el protocolo descrito por el fabricante. Se almacenaron los productos obtenidos a -20 °C hasta su secuenciación.

Los fragmentos del gen 16S ARNr amplificados se secuenciaron por ciclos de extensión en un secuenciador de ADN ABI 373 (Applied Biosystems). Las secuencias se verificaron a través del programa Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y se compararon con las almacenadas en el GenBank mediante el uso del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Orhan-Yanikan et al., 2019).

3.5 Estudio de sensibilidad de los aislados a antimicrobianos

Una vez identificadas las cepas, se seleccionaron aquellas que según bibliografía poseían características patógenas o emergentes y se realizó sobre las mismas un estudio sobre su sensibilidad a diferentes antimicrobianos por el método antibiograma disco-placa del CLSI (2014) o método Kirby-Bauer, el cual se basa en la difusión radial a través del agar.

Los antibióticos seleccionados se presentan en la Tabla 2 y fueron de la familia de β -lactámicos, quinolonas, carbapenemes, aminoglucósidos y tetraciclinas. Estos se seleccionaron según la EFSA (2008) en base a su relevancia en Salud Pública y/o epidemiológica y se dispensaron como discos de antibióticos (OXOID Antimicrobial Susceptibility test disc).

Tabla 2. Antibióticos escogidos para estudiar la resistencia de las cepas a antimicrobianos. Clasificación por grupos. Concentración de cada antibiótico en cada disco en μg . Valores para clasificar en resistentes (R), intermedios (I) o (S) según el diámetro del halo (nm) para cada antibiótico.

| Grupo | Antibiótico | Abreviatura | Conc. (μg) | Intervalo de diámetro de halo (nm) | | |
|---------------------|------------------|-------------|-------------------------|------------------------------------|-------|-----------|
| | | | | R | I | S |
| β -lactámicos | Amoxicilina | AMC | 20/10 | ≤ 13 | 14-17 | ≥ 18 |
| | Cefotaxima | CTX | 30 | ≤ 22 | 23-25 | ≥ 26 |
| | Ceftazidima | CAZ | 30 | ≤ 17 | 18-20 | ≥ 21 |
| | Ceftriaxona | CRO | 30 | ≤ 19 | 20-22 | ≥ 23 |
| | Ampicilina | AMP | 10 | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 |
| Quinolona | Levofloxacino | LEV | 5 | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 |
| | Ciprofloxacino | CIP | 5 | ≤ 15 | 1-20 | ≥ 21 |
| | Ácido nalidíxico | NA | 30 | ≤ 13 | 14-18 | ≥ 19 |
| Carbapenemes | Imipenem | IPM | 10 | ≤ 19 | 20-22 | ≥ 23 |
| | Meropenem | MEM | 10 | ≤ 19 | 20-22 | ≥ 23 |
| Aminoglucósidos | Gentamicina | CN | 10 | ≤ 12 | 13-14 | ≥ 15 |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | TE | 30 | ≤ 11 | 13-14 | ≥ 15 |

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

Para ello, se tomaron colonias de un cultivo puro de 24 h y se inocularon en suero fisiológico al 0,9% estéril, ajustando su turbidez por comparación con el 0,5 de la escala de Mc Farland.

Se impregnó un escobillón con esta disolución y se inocularon dos placas por cepa de agar Mueller-Hinton (MH) (MUELLER-HINTON AGAR, Scharlau, Barcelona, Spain) sin dejar zona libre, pasando el escobillón por el agar en todas las direcciones. Pasados de 3 a 5 minutos, se depositaron los discos con antibióticos. Para ello se utilizó un dispensador de discos (OXOID

Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Dispenser) y no se colocaron más de 6 antibióticos por placa, además de distribuirlos de forma que no se superpusieran los halos de inhibición, como se muestra en la Figura 3.

Como control de calidad de la metodología empleada se empleó la cepa de *E. coli* ATCC 25922, cuyos límites aceptables en los diámetros de las zonas de inhibición están establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Las placas se incubaron de 16 a 18 h a 37 ± 1 °C y en grupos de 5 placas como máximo. Trascurrido este tiempo, se midieron los diámetros de los diferentes halos de inhibición en milímetros, categorizándose su resistencia en sensible (S), intermedia (I) y resistente (R), según las normas establecidas por el (CLSI,2014) para las diferentes bacterias como se muestra en la Tabla 2.

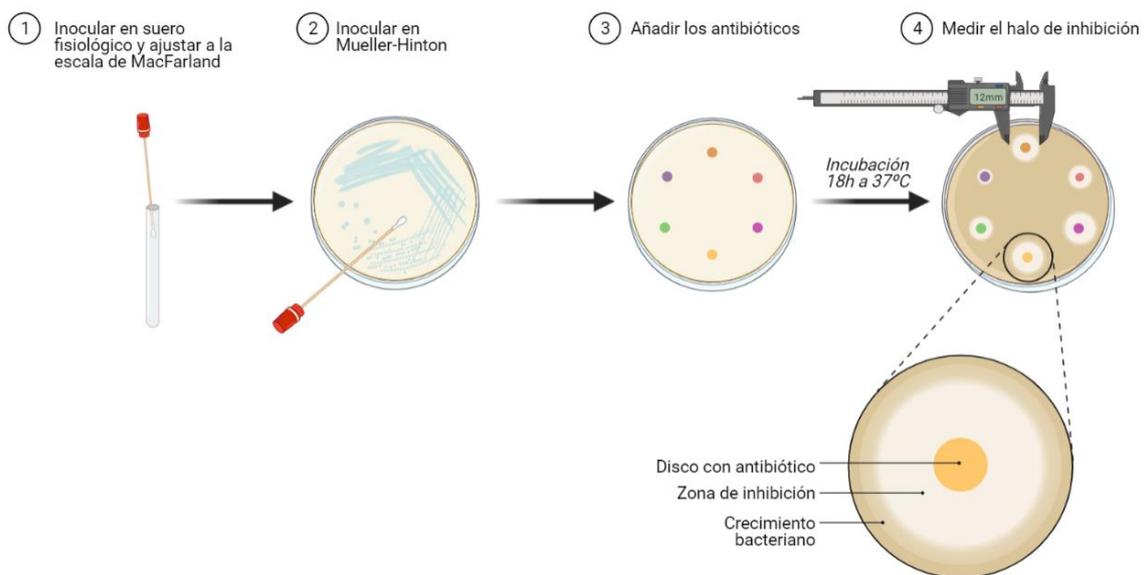


Figura 3. Esquema del método antibiograma disco-placa para estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos.

3.6. Estudio de la presencia de genes de resistencia a antibióticos

3.6.1 Extracción de ADN

Para extraer el ADN de las cepas aisladas, se partió de un cultivo puro de 24 horas en PCA y se resuspendió media asa de cultivo en 1 mL de tampón TE 1X. En el caso de las muestras de los caldos en APT y los caldos de pre-enriquecimiento, los 50 mL recolectados, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el precipitado en 1 mL de tampón TE 1X.

Se realizó la extracción de ADN utilizando el kit de extracción comercial GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), según las indicaciones del fabricante para las bacterias Gram negativas.

3.6.2 PCR multiplex para la detección de genes de resistencia a β -lactámicos

La detección de genes de resistencia se realizó sobre el ADN extraído tanto de los aislados, así como de los caldos de APT sin antibiótico y del APT con cefotaxima y vancomicina, previamente enriquecido.

Se realizó una PCR multiplex para la detección de resistencia a antibióticos β -lactámicos: concretamente los genes bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CMY-2} , cuyos cebadores, secuencias y tamaños de amplicón esperados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Genes de resistencia a β -lactámicos empleados en el estudio

| Gen | Tamaño (pb) | Secuencia | Referencia |
|---------------|-------------|---|---------------------|
| bla_{TEM} | 247 | F 5'-TTAACTGGCGAACTACTTAC-3' R 5'-GTCTATTCGTTCCATCCATA-3' | |
| bla_{SHV} | 393 | F 5'-AGGATTGACTGCCTTTTGG-3' R 5'-ATTTGCTGATTCGCTCG-3' | Kozak et al. (2009) |
| bla_{CMY-2} | 1000 | F 5'-GACAGCCTCTTCTCCACA-3' R 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3' | |

Para la realización de la PCR multiplex se utilizaron 2,5 μ L de ADN sobre un volumen final de 25 μ L, correspondiendo los 22,5 μ L restantes al mix de reactivos. Además, se usaron tanto controles positivos propios empleados en trabajos anteriores y agua MiliQ estéril como control negativo.

Se seleccionaron los genes bla_{TEM} y bla_{SHV} por codificar dos de las tres β -lactamasas de espectro extendido más importantes, y bla_{CMY-2} el cual codifica el plásmido de AmpC- β -lactamasa CMY-2, otorgando resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (Abdel-Kader y Abdel-Moein, 2022).

El mix de reacción utilizado consistió en buffer PCR 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM por cada dNTP, 0,4 μ M de cada cebador del gen bla_{SHV} , 0,2 μ M de cada cebador de los genes bla_{TEM} y bla_{CMY-2} , 5U de BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline), y agua miliQ estéril hasta completar los 22,5 μ L de mix. Se completaron los 25 μ L con 2,5 μ L con ADN.

Las condiciones del termociclador para esta PCR fueron las descritas por (Kozak et al., 2009): 15 minutos a 94 °C, 30 ciclos de amplificación compuestos por 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, y 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Como control positivo se utilizaron las cepas propias de trabajos anteriores 6021b V2 y M1D Mec 8, siendo la primera positiva para bla_{TEM} y bla_{SHV} y la segunda para bla_{CMY-2} .

3.6.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los resultados obtenidos de las PCR realizadas, se analizaron los fragmentos de ADN amplificados mediante gel de agarosa E (Condalab) al 1,5% en tampón TAE 1X (40 mM Tris-HCl [pH 8,3], 2 mM acetato, 1 mM EDTA), al cual se le añadió 5 μ L de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Washington, USA) por 100 mL de gel preparado, lo que nos permitió revelar las bandas a posteriori. Las condiciones de la electroforesis fueron 90V durante 75 minutos, tras lo que se observaron los resultados con un transiluminador (TransilluminatorVilber, Lourmat, France) con luz UV.

4. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en el trabajo como resultado del análisis de 42 muestras de vegetales procedentes de cultivo ecológico

4.1 Calidad higiénico-sanitaria

Los valores obtenidos de los recuentos de los diferentes microorganismos (viables aerobios mesófilos, coliformes totales y *E. coli*), recogidos en la tabla A.1 del anexo, fueron analizados mediante el programa SATGRAPHICS Centurion XVIII (<https://statgraphics.net/>). Se compararon mediante la prueba LSD de Fisher. Los resultados se expresan gráficamente como medias de los recuentos y sus intervalos de confianza al 95%: viables aerobios mesófilos, (Figura 4), coliformes totales (Figura 5), y *E. coli* (Figura 6).

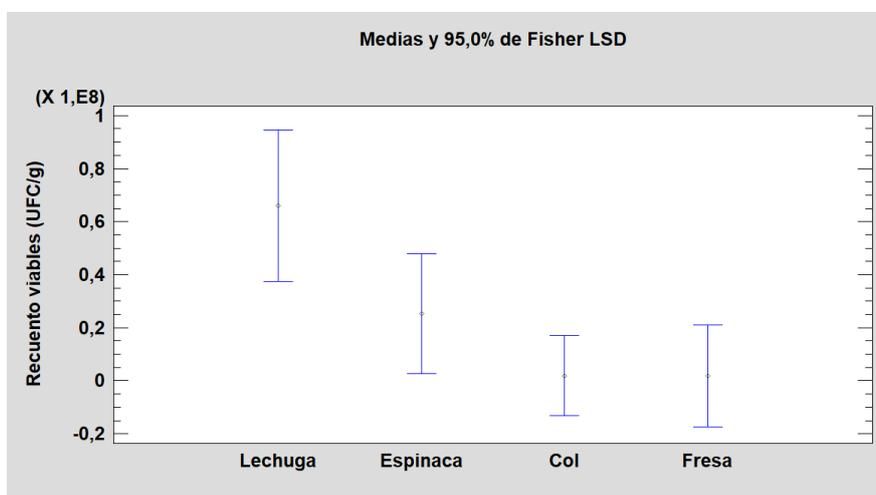


Figura 4: Diagrama LSD de microorganismos viables aerobios mesófilos (UFC/g) detectados en los 4 grupos de muestras analizadas

Los valores de viables aerobios mesófilos varían de 140 (UFC/g) a $2,99 \times 10^8$ (UFC/g), perteneciendo el más bajo de ellos a una de las 11 muestras de fresas (EF79) la única muestra analizada de cultivo convencional, y el más elevado, a una de las 5 muestras de lechuga (EF59). La carga de las muestras de lechuga varía entre $1,66 \times 10^6$ (UFC/g) y $2,99 \times 10^8$ (UFC/g); la de espinaca, entre $1,15 \times 10^6$ (UFC/g) y $9,4 \times 10^7$ (UFC/g); la de col, entre 915 (UFC/g) y $1,68 \times 10^7$ (UFC/g) y las fresas, entre 140 (UFC/g) y $1,99 \times 10^7$ (UFC/g).

Con la prueba LSD (Figura 4) se confirmó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables ($p = 0,0365$). Existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza en los pares lechuga-col y lechuga-fresa. Lo que indica que la carga microbiana de las muestras de lechuga es significativamente mayor a la obtenida en las muestras de col y fresa.

El recuento de viables aerobios mesófilos es más un indicativo de descomposición del alimento que de contaminación, significando una alteración del alimento aquel valor mayor a 10^7 UFC/g. De todos los recuentos realizados, solo se obtuvo un valor superior en una de las muestras analizadas, EF59, correspondiente a lechuga, y cuyo valor fue de $2,99 \times 10^8$.

En el caso de los valores de coliformes totales, estos varían entre 0 (UFC/g) y $2,78 \times 10^6$ (UFC/g), perteneciendo el más bajo de ellos a una de las 11 muestras de fresas (EF79), la única muestra analizada de cultivo convencional; y el más elevado, a una de las 5 muestras de espinacas (EF69). La carga de las muestras de lechuga varía entre $5,5 \times 10^4$ (UFC/g) y $1,23 \times 10^7$ (UFC/g); la de espinaca, entre $1,42 \times 10^5$ (UFC/g) y $2,78 \times 10^7$ (UFC/g); la de col, entre 450 (UFC/g) y $3,39 \times 10^5$ (UFC/g) y las fresas, entre 0 (UFC/g) y $2,9 \times 10^5$ (UFC/g).

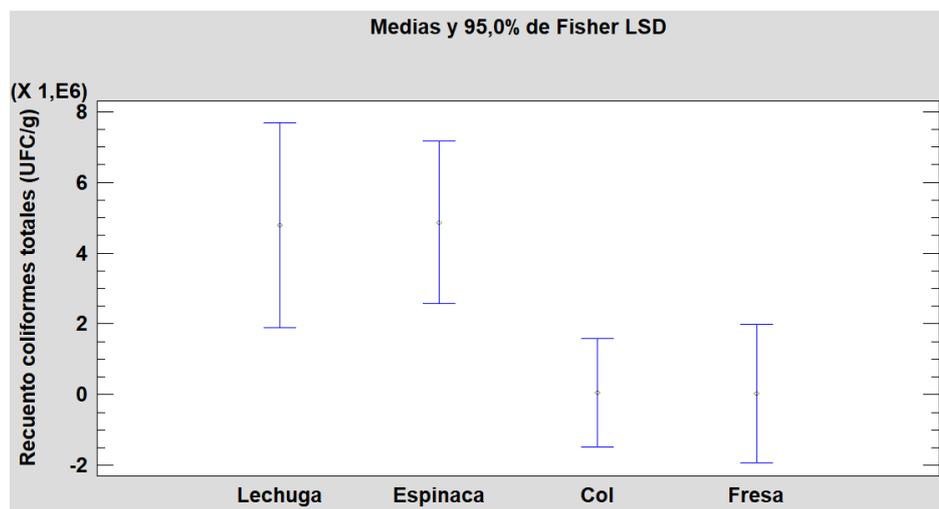


Figura 5: Diagrama LSD de microorganismos coliformes (UFC/g) detectados en los 4 grupos de muestras analizadas

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las medias de los 4 tipos de vegetales ($p = 0,029$), siendo los niveles de coliformes semejantes para lechugas y espinacas, por una parte, y para coles y fresas, por otra.

Para los valores de coliformes totales, se estableció el límite higiénico en 10^4 UFC/g (Pascual & Calderón, 1999), valor que fue superado en 15 muestras: en todas las muestras de espinacas, en 4 de las 5 muestras de lechuga y en 3 muestras de col.

En cuanto a los resultados obtenidos para los recuentos de *E. coli* el análisis estadístico estableció que no existe diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada uno de los cuatro tipos de vegetales ($p = 0,2471$). Los valores detectados variaron entre 0 (UFC/g) y $5,2 \times 10^6$ (UFC/g). El mayor valor se obtuvo en la muestra EF69, correspondiente a espinaca.

No se detectó *E. coli* en ninguna de las muestras de col y fresa analizadas, por lo que sus medias en la prueba LSD es 0. En la Figura 5 se grafican unos intervalos para ambas muestras basados en la prueba LSD de Fisher, contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se solapan un 95,0% de las veces. En lechuga la carga varió de 0 (UFC/g) a $2,5 \times 10^5$ (UFC/g) y en espinaca, de 0 (UFC/g) a $5,2 \times 10^6$ (UFC/g).

Por último, el Reglamento (CE) 2073/2005, establece el límite higiénico aceptable en 1000 (UFC/g) para *E. coli*. Hay que destacar que todas aquellas muestras en las que se detectó este microorganismo, superaron este valor: EF61, EF62, EF89, EF66 y EF69 (siendo las 3 primeras muestras de lechuga, y las dos últimas de espinaca).

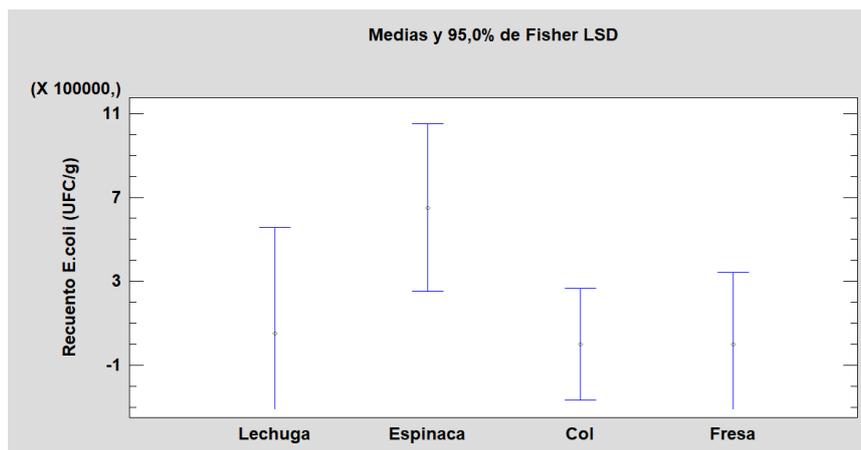


Figura 6.: Diagrama LSD de *E. coli* (UFC/g) detectados en los 4 grupos de muestras analizadas

4.2 Identificación bioquímica de los aislados resistentes a antibióticos

De las 42 muestras analizadas se consiguieron aislar 302 cepas, de las cuales 43 fueron Gram negativas, oxidasa negativo y catalasa positivo, además de posibles sospechosas de ser resistentes a antibióticos. 22 de los aislados procedieron de col, 17 de fresas, 3 de espinaca y 1 de lechuga. 20 de las cepas eran presuntamente resistentes a cefalosporinas, al ser aisladas de agar MacConkey suplementado con CTX y las 23 restantes resistentes a carbapenemes al ser aisladas de agar mSuperCARBA.

El resultado de la identificación de los aislados tras realizar la tira API 20E se muestra en la Tabla 4; 19 aislados fueron identificados dentro del grupo KESC (7 *Klebsiella* spp., 5 *Enterobacter* spp., 5 *Serratia* spp., 1 *Yersinia enterocolítica*, y 1 *Salmonella* spp.), 16 como *Acinetobacter baumannii* (*Moraxellales*), 7 como *Stenotrophomonas maltophilia* (*Xanthomonadal*), y 1 como *Pasteurella pneumotropica*.

Tabla 4: Identificación de las cepas aisladas mediante tiras API 20E

| Muestras | Nº cepas | Identificación API 20E |
|--|----------|-------------------------------------|
| EF69SC-2, EF69M-3, EF70M-5, EF72M-4, EF74SC-1, EF74SC-3, EF76SC-5, EF79M-2, EF79M-3.1, EF81SC-5, EF84SC-5, EF87SC-3, EF91M-4, EF91M-5, EF93SC-3, EF95M-1 | 16 | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| EF73SC-2, EF73SC-4, EF73SC-5, EF74M-1, EF87SC-2, EF87SC-4, EF88SC-4 | 7 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| EF63SC-1, EF63SC-2, EF63SC-3, EF77M-3, EF79M-3.2, EF84M-4 | 6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| EF70M-2, EF70M-4, EF71SC-4, EF72SC-2, EF72SC-3 | 5 | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| EF84M-1, EF84M-5, 91M-1, EF91M-2, EF91M-3 | 5 | <i>Serratia ficaria</i> |
| EF69SC-3 | 1 | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| EF79M-1 | 1 | <i>Pasteurella pneumotrópica</i> |
| EF87SC-5 | 1 | <i>Salmonella</i> spp. |
| EF64SC-1 | 1 | <i>Yersinia enterocolítica</i> |

M: aislados de MacConkey+CTX; SC: aislados de mSuperCARBA

4.3 Identificación molecular de los aislados

Mediante la identificación bioquímica con las tiras API 20E se identificaron 16 cepas como *Acinetobacter baumannii*, cuyo porcentaje de identificación varió entre un 5,6% y un 98,7%, por lo que se procedió a la secuenciación del gen 16S ARNr. Los resultados obtenidos se recogieron en la tabla B.1 del anexo. Como se observa en la Tabla 5, tan solo el 50% de las cepas identificadas como *Acinetobacter baumannii* por la tira API 20E, resultaron ser de género *Acinetobacter*. Dentro de este género encontramos las especies *A. pittii*, *A. baumannii*, *A. cacoaceticus* y *Acinetobacter sp.* Solo una de las 16 cepas identificadas bioquímicamente como *A. baumannii*, fue confirmada por método molecular.

Siete de las 16 cepas, es decir, un 43,75%, resultó ser del género *Pseudomonas*, concretamente de las especies *Ps. putida*, *Pseudomonas sp.*, *Ps. reinekei* y *Ps. reidholzensis*. Estos microorganismos son oxidasa positivos, a diferencia de *Acinetobacter*, por lo que la aparición de aislados identificados dentro de este género discrepa de los resultados de la prueba oxidasa, ya que su resultado es un campo requerido a introducir en la APIWEB, herramienta informática que proporciona los resultados de la tira API 20E.

Tabla 5. Identificación molecular de los aislados sospechosos de *Acinetobacter baumannii*

| Código de cepas | Especie identificada |
|--|--|
| EF69M-3 | <i>Acinetobacter pittii</i> |
| EF72M-4 | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| EF74SC-1, EF74SC-3, EF81SC-5, EF91M-4, EF91M-5, EF95M-1 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter sp.</i> |
| EF69SC-2 | <i>Pseudomonas putida</i> |
| EF76SC-5, EF79M-2, EF84SC-5, EF87SC-3 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| EF79M-3 | <i>Pseudomonas reinekei</i> |
| EF93SC-3 | <i>Pseudomonas reidholzensis</i> |
| EF70M-5 | <i>Enterobacter cancerogenus</i> |

M: aislados de MacConkey+CTX; SC: aislados de mSuperCARBA

Estos resultados coincidieron en un 50% con la identificación por pruebas bioquímicas, pudiéndose asociar un error experimental a la hora de realizar la prueba de la oxidasa o al hacer la tira API, sumado a una menor precisión si se compara con el método molecular. Es por ello por lo que la identificación molecular se amplió a todas las cepas aisladas, obteniéndose los resultados reflejados en la tabla B.2 del anexo. Solo 9 de las 27 cepas restantes, un 33,3%, se identificaron como microorganismos del mismo género por ambos métodos. 12 de los aislados que habían sido clasificados como gramnegativos, resultaron del género *Pseudomonas*. Sin embargo, 6 de las 7 presuntas *Stenotrophomonas maltophilia* resultaron serlo, al igual que 4 de las 5 presuntas *Enterobacter*. También hay que mencionar que los aislados que habían sido clasificados como *Klebsiella pneumoniae* bioquímicamente, resultaron ser *Raoultella terrigena*.

Si tenemos en cuenta todas las cepas, la identificación bioquímica coincidió con la molecular en un 39,5%. Por otro lado, la presencia de *Pseudomonas*, al ser grampositivas, se relaciona directamente con la prueba oxidasa positiva, por lo que esta ha fallado en un 44,2%.

A partir de los resultados de la identificación molecular, la clasificación de los 43 aislados queda reflejada en la Tabla 6: 19 aislados fueron identificados como *Pseudomonas spp.*, 8 como *Acinetobacter spp.* (*Moraxellales*), 6 como *Stenotrophomonas maltophilia* (*Xanthomonadales*) y 8 dentro del grupo KESC (5 *Enterobacter spp.*, 3 *Raoultella terrigena* y 1 *Pantoea ananatis*).

Tabla 6. Identificación molecular de todas las cepas aisladas.

| Muestras | Nº de cepas | Identificación |
|---|-------------|-------------------------------------|
| EF69M-3, EF72M-4, EF74SC-1, EF74SC-3, EF81SC-5, EF91M-4, EF91M-5, EF95M-1 | 8 | <i>Acinetobacter</i> spp. |
| EF73SC-2, EF73SC-4, EF73SC-5, EF74M-1, EF87SC-2, EF87SC-4 | 6 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| EF64SC-1, EF70M-2, EF70M-4, EF72SC-2, EF72SC-3 | 5 | <i>Enterobacter</i> spp. |
| EF63SC-1, EF63SC-2, EF63SC-3 | 3 | <i>Raoultella terrigena</i> |
| EF69SC-3 | 1 | <i>Pantoea ananatis</i> |
| EF69SC-2, EF71SC-4, EF76SC-5, EF77M-3, EF79M-1, EF79M-2, EF79M-3, EF73M-3.2, EF84SC-5, EF84M-1, EF84M-4, EF85M-5, EF87SC-3, EF87SC-5, EF88SC-4, EF91M-1, EF91M-2, EF91M-3, EF93SC-3 | 19 | <i>Pseudomonas</i> spp. |

M: aislados de MacConkey+CTX; SC: aislados de mSuperCARBA

4.4 Sensibilidad de los aislados a antimicrobianos

En la Tabla 7, se muestra los resultados de los antibiogramas realizados sobre los 42 aislados, agrupados según patrones de resistencia.

Tabla 7. Patrones de resistencia a antibióticos en los aislados

| Patrones de resistencia | Nº de cepas | Código de cepas |
|--------------------------------|-------------|---|
| AMC | 7 | EF74SC-1, EF77M-3, EF79M-3.2, EF84M-5, EF91M-2, EF91M-3, EF93SC-3 |
| AMP | 5 | EF63SC-2, EF69SC-3, EF79M-2, EF84M-1, EF95M-1 |
| AMC-AMP | 10 | EF63SC-1, EF64SC-1, EF69M-3, EF70M-4, EF71SC-4, EF72SC-2, EF72M-4, EF79M-1, EF84M-4, EF87SC-3 |
| AMC-AMP-CTX | 3 | EF70M-2, EF81SC-5, EF88SC-4 |
| AMC-AMP-NA | 2 | EF87SC-5, EF79M-3.1 |
| AMC-AMP-MEM | 1 | EF63SC-3 |
| AMC-AMP-TE | 1 | EF91M-5 |
| AMC-AMP-IPM-CN | 2 | EF73SC-4, EF73SC-5 |
| AMC-AMP-MEM-NA | 1 | EF84SC-5 |
| AMC-AMP-CAZ-TE | 1 | EF91M-4 |
| AMC-AMP-CAZ-CRO | 1 | EF72SC-3 |
| AMC-AMP-CAZ-CTX | 1 | EF70M-5 |
| AMC-AMP-CN-MEM-CTX | 1 | EF76SC-5 |
| AMC-AMP-MEM-IPM-CTX-CRO-CN | 4 | EF73SC-2, EF74M-1, EF87SC-2, EF87SC-4 |
| AMC-AMP-MEM-IPM-CTX-CRO-TE | 1 | EF74SC-3 |
| AMC-AMP-MEM-IPM-CN-CTX-CRO-CAZ | 1 | EF69SC-2 |

AMC: amoxicilina, AMP: ampilina; CTX: cefotaxima, NA: ácido nalidixico, MEM: meropenem, TE: tetraciclina, IPM: imipenem, CN: gentamicina, CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriaxona. M: aislados de MacConkey+CTX, SC: aislados de mSuperCARBA.

Según la clasificación de antibióticos de la OMS (WHO, 2019), los antibióticos ensayados se dividen en los siguientes grupos: tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes.

Se encontraron 16 perfiles de resistencia para las 43 cepas. De estos 16, 7 se componían exclusivamente de antibióticos de la familia de β -lactámicos, por lo que 31 cepas de las ensayadas eran resistentes solo a estos antibióticos. Además, en 4 de los perfiles encontrados se reflejó resistencia a los tres grupos que componen la familia de β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes). El patrón de resistencia más repetido fue el de AMC-AMP (penicilinas), en 10 de los aislados, 5 provenientes de los aislamientos en mSuperCARBA y 5 de MacConkey+CTX. Le siguió la resistencia a AMC presente en 7 cepas, y a AMP, en 5 cepas. En todos los perfiles de resistencia restantes estuvieron AMP y AMC, por lo que todos eran resistentes a las dos penicilinas ensayadas. El siguiente patrón más repetido, en 4 de los aislados, fue el de AMC-AMP-MEM-IPM-CTX-CRO-CN, siendo resistentes a 7 de los 12 antibióticos ensayados, clasificados como penicilinas, carbapenemes, cefalosporinas y aminoglucósidos.

Se consideraron multirresistentes aquellas cepas que manifestaron resistencia a 3 o más clases de antibióticos (Magiorakos et al., 2012), por lo que 7 de los 16 perfiles encontrados cumplen esta condición, asociándose multirresistencia a 11 de las 43 cepas ensayadas, un 25,58%. Los aislados multirresistentes lo fueron en un 13,95% a penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y aminoglucósidos: un 4,65 % a penicilinas, carbapenemes y aminoglucósidos; un 2,33% a penicilinas, carbapenemes y quinolonas; un 2,33% a penicilinas, cefalosporinas y tetraciclinas; y un 2,33% a penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y tetraciclinas.

En la Figura 7 se refleja la susceptibilidad conjunta a los 12 antibióticos ensayados sobre las 43 cepas, agrupados por familias (tetraciclinas, β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos), diferenciándose tres grupos dentro de la familia de β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes).

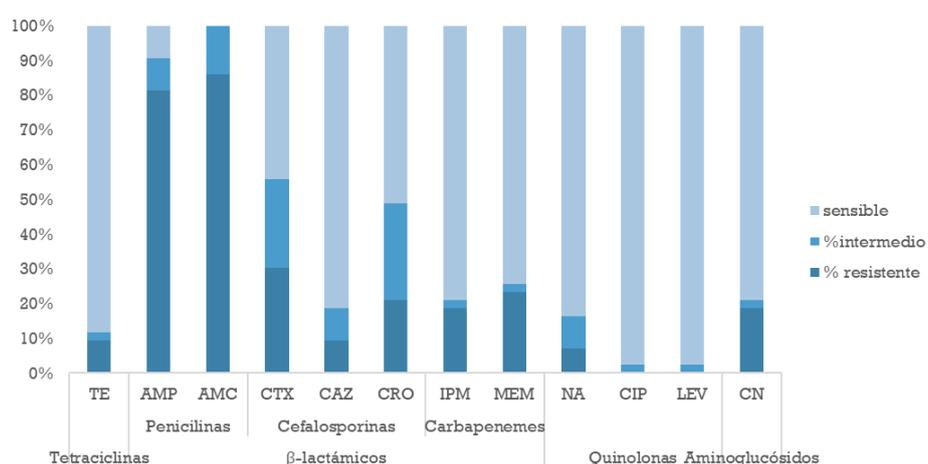


Figura 7. Sensibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas.

Los resultados de los antibiogramas revelan una gran variabilidad en la sensibilidad de los aislados según las diferentes familias de antimicrobianos ensayados, aunque es clara la predominancia de la resistencia a β -lactámicos, especialmente frente a las penicilinas AMC (86,1% de los aislados) y AMP (81,4%). Seguidos de estos dos antibióticos, destaca que un 30,2% de los aislados presentaron resistencia a la cefalosporina CTX, un 23,3% al carbapenémico MEM; un 20,9% a la cefalosporina CRO; un 18,6% al aminoglucósido CN, y al carbapenémico IPM; un

9,3% a la cefalosporina CAZ y a TE, y un 6,9% a la quinolona NA. Por el contrario, las quinolonas fueron los antibióticos frente a los cuales se mostró más susceptibilidad entre los aislados, destacando la nulidad de cepas resistentes a Ciprofloxacina y Levofloxacino. Solo hubo una cepa que no manifestó resistencia ante ninguno de los doce antibióticos, EF91M-1.

A continuación, se muestran los resultados del estudio de sensibilidad de los aislados agrupados por según el vegetal a partir del cual se aislaron (Figuras 8, 9, 10 y 11).

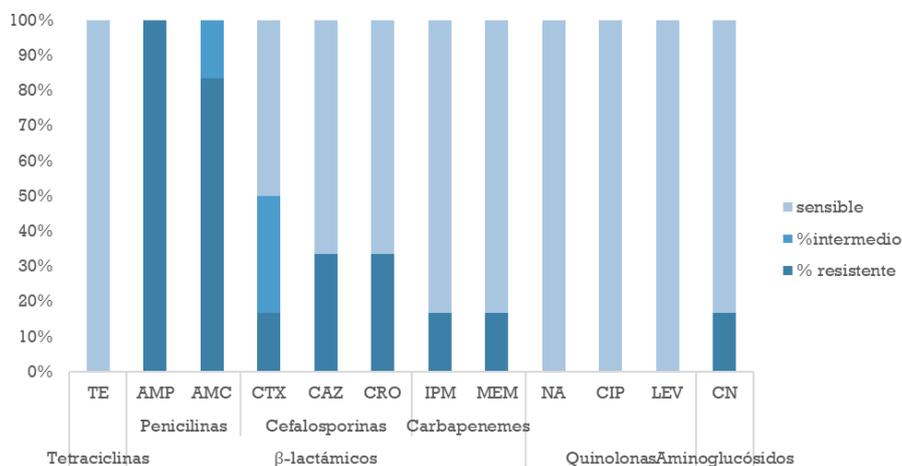


Figura 8. Sensibilidad a antimicrobianos en espinacas

Los microorganismos obtenidos a partir de espinacas (Figura 8) presentaron resistencia ante 2 de las 4 familias de antibióticos ensayadas: β-lactámicos y aminoglucósidos, y concretamente, a todos los grupos de β-lactámicos. Las 6 cepas aisladas a partir de espinaca resultaron resistentes a penicilinas (6 a AMP y 5 a AMC). Un 33,33% de los aislados fueron sensibles a las cefalosporinas CAZ y CRO y un 16,67% a CN, CTX y los carbapenémicos IPM y MEM.

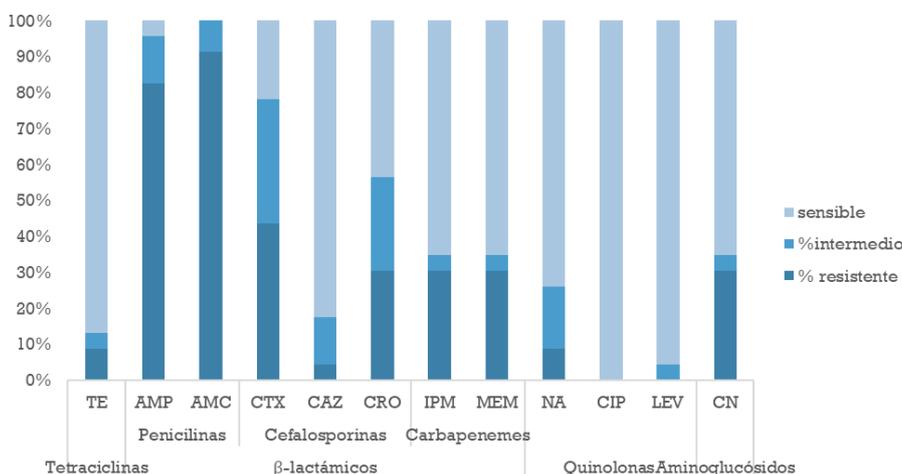


Figura 9. Sensibilidad a antimicrobianos en col

En los microorganismos aislados a partir de col (Figura 9), se observó una elevada resistencia frente a penicilinas, concretamente un 91,3% frente a AMC y un 82,61% frente a AMP. Ya por debajo del 50% y siguiendo con la familia de antibióticos β-lactámicos, encontramos que un 43,48% de cepas manifestaron resistencia frente a la cefalosporina de 3ª generación CTX, y un 30,43% frente a los carbapenémicos, la cefalosporina CRO y el aminoglucósido CN. Solo un 8,7% de los aislados resultó resistente a TE y NA, de la familia de tetraciclinas y quinolonas

respectivamente. Ninguno de los 22 aislados de col presentó resistencia a CIP y LEV, antibióticos del grupo de las quinolonas.

El 76,92% de los aislados de fresa (Figura 10) presentaron resistencia a AMC, seguido del 89,23% a AMP, las penicilinas ensayadas. Después de estos dos, el porcentaje de bacterias resistentes descendió hasta un 15,38% frente a TE, y a un 7,69% frente a CTX, MEM, CAZ y NA. Ninguna cepa fue resistente a los β -lactámicos IPM (carbapenem) y CRO (cefalosporina), las quinolonas CIP y LEV, y el aminoglucósido CN.

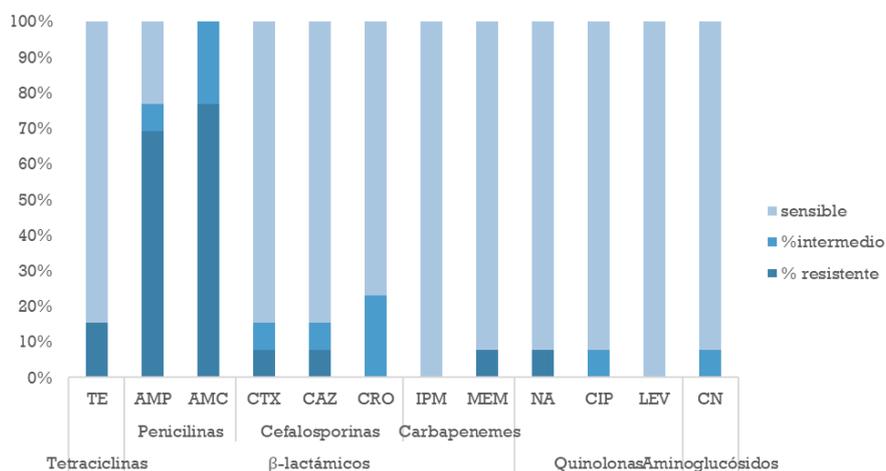


Figura 10. Sensibilidad a antimicrobianos en fresa

El único aislado procedente de lechuga (Figura 11) presentó resistencia únicamente a antibióticos de la familia de β -lactámicos, concretamente a las penicilinas AMP y AMC, a la cefalosporina CTX y al carbapenem MEM.

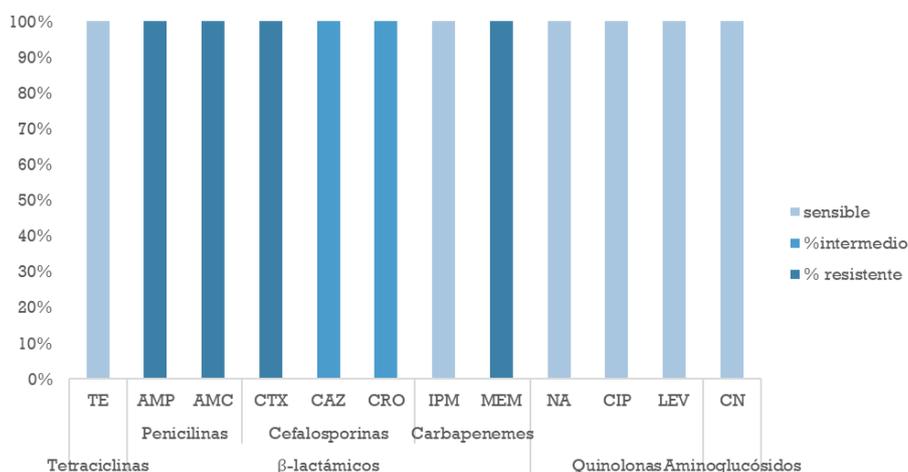


Figura 11. Sensibilidad a antimicrobianos en lechuga

4.5 Genes de resistencia a β -lactámicos: bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CMY-2}

Se realizó PCR multiplex para la detección de los genes bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CMY-2} , genes de resistencia a β -lactámicos, sobre las 43 cepas aisladas, en las muestras diluidas en APT sin antibióticos y en las muestras procedentes del pre-enriquecimiento en APT suplementada con antibióticos (cefotaxima y vancomicina).

No se detectó ninguna amplificación en el caso de las muestras procedentes del APT ni del pre-enriquecimiento. Con respecto a las cepas, los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} fueron detectados en 9 cepas aisladas de 5 muestras distintas (2 de espinaca, 2 de col y 2 de fresa) (Tabla 8); 4 de las 9 cepas fueron identificadas como *Acinetobacter* spp., habiendo sido aisladas de los tres tipos de vegetales mencionados. Las bacterias del grupo KESC positivas para ARG fueron aisladas de espinaca y col. Por último, los aislados positivos del género *Pseudomonas* spp. fueron aislados de muestras de fresa. En general, el 50 % de aislados de *Acinetobacter* spp., 25 % de KESC, 16,7 % de *Stenotrophomonas maltophilia* y 10,5% de *Pseudomonas* spp. resultaron positivos para algún gen.

Tabla 8. Genes detectados en las cepas aisladas, clasificados por vegetal, código y cepa de origen.

| vegetal | código | Cepa | <i>bla</i> _{TEM} | <i>bla</i> _{SHV} | <i>bla</i> _{CMY-2} |
|----------|----------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| espinaca | EF69M-3 | <i>Acinetobacter pittii</i> | - | + | - |
| | EF69SC-3 | <i>Pantoea ananatis</i> | + | - | - |
| col | EF70M-4 | <i>Enterobacter</i> sp. | + | - | - |
| | EF74M-1 | <i>Stenotrophomonas</i> sp. | + | - | - |
| | EF74SC-1 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | + | - | - |
| fresa | EF79M-2 | <i>Pseudomonas</i> sp. | + | - | - |
| | EF91M-3 | <i>Pseudomonas otzyzhihabitans</i> | + | - | - |
| | EF91M-4 | <i>Acinetobacter</i> sp. | + | - | - |
| | EF91M-5 | <i>Acinetobacter</i> sp. | + | - | - |

En la Figura 12, en 2 aislados (EF91M-4 y EF91M-5 de fresa), se aprecia una banda inespecífica, cercana a la correspondiente al gen *bla*_{CMY-2}; además estos dos aislados presentan la banda correspondiente al gen *bla*_{TEM}.

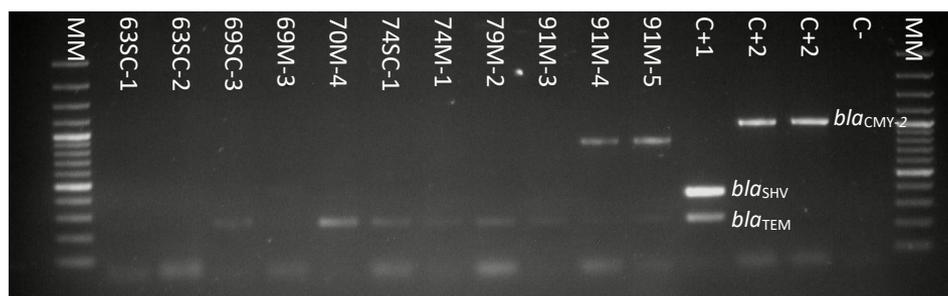


Figura 12. Gel de electroforesis de la reacción de PCR para los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2}.

En la Tabla 9 se muestra la frecuencia de detección de los genes en las cepas aisladas según vegetal. En un 16,7% de las cepas aisladas a partir de espinaca se detectó el gen *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}; en un 13,6% de las cepas de col y en un 23,5% de las cepas aisladas a partir de fresa se detectó el gen *bla*_{TEM}.

Tabla 9. Frecuencia de detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2} en los aislados.

| Vegetal | <i>bla</i> _{TEM} | <i>bla</i> _{SHV} | <i>bla</i> _{CMY-2} |
|----------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Lechuga | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| Espinaca | 16,7% | 16,7% | 0,00% |
| Col | 13,6% | 0,00% | 0,00% |
| Fresa | 23,5% | 0,00% | 0,00% |

5. DISCUSIÓN

5.1 Calidad higiénico-sanitaria

La presencia de viables aerobios mesófilos en los vegetales y frutas implican una alteración del alimento, una descomposición de este y no tanto un riesgo, como se ha mencionado anteriormente; es por ello por lo que el límite higiénico aceptable, 10^7 UFC/g, es mayor que el establecido para *E. coli* y coliformes totales, ya que éstos son indicativos de contaminación fecal. Ha sido en una muestra de lechuga, EF59, en la única en la que se ha encontrado un valor por encima del límite higiénico, con $2,99 \times 10^8$ UFC/g, lo que supone que sólo un 2,4% del total de las muestras analizadas presentaron una baja calidad higiénico, del cual 20% fueron muestras de lechuga. Por lo que su consumo se puede considerar seguro, siempre que se realicen unas correctas prácticas de lavado antes de su consumo.

Se observó una mayor presencia de viables aerobios mesófilos microorganismos en los vegetales de hoja verde que en la fresa, y dentro de las hortalizas, la mayor cantidad se encontró en lechuga. Esta distribución contrasta con la obtenida en un estudio anterior (Charles et al., 2018), donde los valores fueron mayores para espinaca que para lechuga. En el caso de las muestras de lechuga, los valores obtenidos para viables aerobios mesófilos oscilaron entre $1,66 \times 10^6$ (UFC/g) y $2,99 \times 10^8$ (UFC/g), valores mayores que los reportados por Oliveira et al. (2010), que se encuentran entre 10^5 y 10^7 UFC/g, también en muestras orgánicas. En espinacas se obtuvieron valores entre $1,15 \times 10^6$ (UFC/g) y $9,4 \times 10^7$ (UFC/g), que concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores (Charles et al., 2018; Allen et al., 2013) donde oscilaron entre 10^5 y 10^7 (UFC/g). En el caso de la col, los valores fueron de entre 915 (UFC/g) y $1,68 \times 10^7$ (UFC/g), variación parecida a la obtenida en (Kuan et al., 2017). Sin embargo, los recuentos obtenidos en espinaca, lechuga y col son similares a los obtenidos por Badosa et al. (2013), clasificados como vegetales crudos, y cuyos valores se encuentran entre 10^6 y 10^8 (UFC/g). En este mismo estudio, reportan valores de 10 a 10^8 UFC/g para viables aerobios mesófilos en fresa, similar a los valores obtenidos en el presente estudio ($140 - 1,99 \times 10^7$ (UFC/g)). Todas estas variaciones, se pueden deber a diversos factores como el comercio del cual se obtienen, el origen, como han sido tratadas las muestras en el campo, o incluso por manipulación de las muestras durante su procesado.

En cuanto al recuento de coliformes totales encontramos un 35,7% de muestras que superan el límite higiénico de 10^4 UFC/g, indicativo de contaminación. Concretamente, este valor fue superado por el 100% de las muestras de espinaca, el 80% de las de lechuga, y el 27,3% de col. Todas las muestras de fresa se encontraron dentro del límite higiénico. Esto puede deberse al contacto directo de las hortalizas con el suelo durante su cultivo, en comparación con las fresas. En este caso la recomendación de un correcto lavado y eliminación de las hojas exteriores garantizará al consumidor un menor riesgo microbiológico.

Los valores de coliformes totales en las hortalizas de hoja verde variaron de 450 (UFC/g) a $2,78 \times 10^6$ (UFC/g), más elevados si se compara con la bibliografía (Mukherjee et al., 2004; Abadías et al., 2008). Sin embargo, estos valores vuelven a ser similares a los obtenidos por Badosa et al. (2013), entre 10^4 y 10^6 (UFC/g). El valor máximo que se obtuvo en fresas fue de $2,9 \times 10^5$ (UFC/g), menor que el máximo reportado por los mismos autores, 10^8 (UFC/g).

E. coli es un coliforme cuya presencia indica contaminación fecal. En este estudio solo se detectó en muestras de lechuga y espinaca, hasta $2,5 \times 10^5$ (UFC/g) y $5,2 \times 10^6$ (UFC/g) respectivamente.

Fue detectado en 5 de las 42 muestras estudiadas, es decir, en un 11,9%, correspondientes a un 60% de las muestras de lechuga, y un 18,16% de las de espinaca. En el 100% de las muestras donde se detectó este microorganismo, la carga superó el límite higiénico aceptable, siendo este de 1000 (UFC/g), establecido por el Reglamento (CE) 2073/2005. Estos valores son elevados si se compara con la bibliografía (Mukherjee et al., 2006; Allen et al., 2013), donde los valores obtenidos en vegetales y fresa son nulos o más bajos.

Por tanto, aunque los valores para viables aerobios mesófilos se encontraron dentro de los límites establecidos, los valores obtenidos para coliformes superaron el límite higiénico aceptable en algunas muestras de hortalizas. En lechuga y espinaca, muestras para las que se encontró la mayor carga de coliformes, también se encontró *E. coli*, excediendo el límite higiénico establecido. Es evidente una relación entre la carga coliformes totales y la probabilidad de encontrar *E. coli*, ya que es un tipo de coliforme.

5.2 Identificación bioquímica y molecular de los aislados resistentes a antibióticos

Se han aislado un total de 302 cepas a partir de las muestras analizadas, de las que 43 (14,2%) fueron Gram negativas, oxidasa negativo y catalasa positivo, además de ser presuntivamente resistentes a antibióticos, ya que se aislaron de caldos de pre-enriquecimiento y medios de cultivos suplementados con antibióticos. Las 43 cepas fueron identificadas mediante tiras API 20E, pero al comparar los resultados con la identificación molecular por secuenciación del gen 16S ARNr, se encontró que el grado de similitud no fue el esperado. Concretamente, los resultados coincidieron en un 39,5%. Esto muestra una baja precisión de los métodos bioquímicos de identificación comparado con los moleculares, hecho que se corrobora en otros estudios. Es el caso del estudio realizado por Osman, et al (2020), donde el 55,6% de los aislados que habían sido identificados mediante las tiras API 20E como *K. pneumoniae* fueron confirmados mediante PCR. Hay que destacar que los aislados identificados como *K. pneumoniae* por las pruebas miniaturizadas API 20E, fueron re-identificados como *Raoultella terrigena* por secuenciación, perteneciente a un género que se estableció en 2001 y cuya relevancia clínica y epidemiológica aún no está clara. Esta caracterización errónea se ha dado en más casos, y como se explica en Appel et al. (2021), en la mayoría de los casos, estos dos géneros son indistinguibles en clínica por sus similitudes ecológicas, bioquímicas y microbiológicas.

El otro resultado a discutir es la aparición de *Pseudomonas* spp., siendo el género predominante en las colonias aisladas. La presencia de estas se asocia con un error en la prueba oxidasa, siendo este del 44,2% en la caracterización de las bacterias Gram negativas. Esto repercute directamente en los resultados de las tiras API 20E, ya que el resultado de esta prueba es requerido en la APIWEB, afectando a todo el estudio posterior. Al ser un requisito, si se eliminaran estos microorganismos de los resultados, el porcentaje de acierto de las tiras API 20E aumentaría hasta un 70,8%, un valor más aceptable, aunque siga siendo más impreciso que los métodos moleculares.

5.3 Sensibilidad de los aislados a los antimicrobianos

Los antibiogramas realizados a los aislados mostraron que todas las cepas eran resistentes a algún antibiótico, a excepción de la EF91M-1, aislada a partir de fresa y caracterizada como

Pseudomonas oryzae. El 100% de las 42 cepas restantes fue resistente a penicilinas (AMP y/o AMC). De las 43 cepas aisladas, el 66,7% era resistente solo ante antibióticos β -lactámicos; el 16,3% a penicilinas y aminoglucósidos; el 6,9% a penicilinas y quinolonas; y el 4,7% a penicilinas y tetraciclinas. Dentro de la resistencia exclusiva a β -lactámicos, encontramos que el 51,2% de las 43 cepas eran resistentes únicamente a penicilina; un 6,9% a la cefalosporina de tercera generación CTX; y un 2,3% al carbapenem MEM. La predominancia de resistencia a antibióticos β -lactámicos, y concretamente a penicilinas, coincide con un estudio anterior sobre *Enterobacteriaceae* aisladas de vegetales y frutos frescos (Al-Hharousi et al., 2019).

Un 25,6% de las cepas (11), mostraron multirresistencia, por ser resistentes a 3 o más clases de antibióticos (Magiorakos et al., 2012). Esta multirresistencia se debe a una combinación de las dos o tres clases de antibióticos β -lactámicos con un antibiótico de otra familia, en ningún caso se ha detectado resistencia a tres o más familias de antibióticos. El porcentaje de multirresistencia detectado ha sido menor que en el estudio llevado a cabo por Mutuku et al. (2022), en el que 65,1% de los aislados estudiados fueron multirresistentes. Hay que destacar que, en ese estudio, las mayores ratios de multirresistencia se encontraron en aislados obtenidos en los alrededores de zonas hospitalarias y los menores, en los obtenidos a partir de aguas residuales municipales.

Si comparamos los resultados según el vegetal estudiado, la tendencia a la predominancia de resistencia a β -lactámicos es común, especialmente a penicilinas. En el caso de la lechuga, al conseguirse solo un aislado, se debería aumentar la muestra para que sea más representativa. El porcentaje de cepas de fresa que presenta resistencia a antibióticos, sin tener en cuenta las penicilinas, es mucho menor si lo comparamos con hortalizas. En cuanto al grupo de tetraciclinas, todas las cepas obtenidas de espinaca y fresa fueron sensibles. Todas las cepas extraídas de espinaca fueron sensibles a quinolonas. El hecho de que los grupos de lechuga y espinaca sean los que más carga presentan de microorganismos, no tiene que significar una mayor amenaza que aquellos que presentan una menor carga, ya que en lechuga solo se aisló una cepa gramnegativa, resistente solo a β -lactámicos; y en espinaca, aunque si se consiguieron más aislados, todos fueron sensibles a tetraciclinas y quinolonas.

En cuanto al medio del que se han aislado, los aislados de MacConkey son presuntamente resistentes a cefalosporinas de tercera generación (CAZ, CTX, CRO); y los de mSuperCARBA, a carbapenemes (MEM, IPM). De los aislados de SC, el 47,8% manifestaron resistencia a carbapenemes. En el caso de los aislados de MC, un 25% fue resistente a alguno o varios de los antibióticos mencionados. Esto se debe a que la concentración de antibióticos, tanto en el caldo de pre-enriquecimiento como en los medios de cultivo, es menor que la presente en los discos. A pesar de haber hecho una búsqueda dirigida para seleccionar bacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes, no ha impedido la coselección del resto de antibióticos.

5.4 Detección de genes de resistencia a β -lactámicos

No se obtuvieron resultados positivos en la PCR multiplex para detectar los genes de resistencia a β -lactámicos *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2} para las muestras directas procedentes del APT ni del pre-enriquecimiento. Sin embargo, sí se detectaron en los aislados procedentes de las mismas, lo cual podría estar relacionado con el grado de dilución de la muestra.

En cuanto a los resultados de búsqueda de ARG en los aislados, no se detectó para ninguno de ellos el gen *bla*_{CMY-2} lo que indica que ningún aislado codifica para el plásmido de AmpC- β -lactamasa CMY-2, que otorga resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (Abdel-Kader et al., 2022). Sin embargo, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, fueron detectados en un 20,9% de las cepas que procedían de los caldos de pre-enriquecimiento, es decir, en ambiente de presión selectiva a antibióticos. Dicha presencia indica que los microorganismos donde se detectaron codifican dos de las tres β -lactamasas de espectro extendido más importantes (Abdel-Kader et al., 2022). El gen más prevalente fue *bla*_{TEM}, encontrándose en 8 de las 42 cepas aisladas, 3 de *Acinetobacter* spp., 2 *Pseudomonas* spp; 2 *Enterobacteriaceae* spp. y 1 *Stenotrophomonas* sp. La única amplificación detectada de *bla*_{SHV} se dio en *Acinetobacter pittii*. Solo dos de las cepas en las que se detectaron ARG fueron aisladas de SC, el resto de MC.

Tanto *Acinetobacter* spp., como *Pseudomonas* spp. y *Enterobacteriaceae* se encuentran en el grupo de prioridad crítica en la de bacterias resistentes a antibióticos elaborada por la OMS. *Acinetobacter* spp y *Pseudomonas* spp. se caracterizan por ser patógenos oportunistas, causantes de infecciones nosocomiales. La presencia de ARG en estos microorganismos conlleva una mayor complejidad a la hora de tratar las infecciones causadas, sobre todo si existe una multirresistencia antibiótica, ya que limita los antimicrobianos efectivos.

Estos resultados concuerdan con estudios anteriores. Relativo a la predominancia de *bla*_{TEM}, en (Shia et al., 2020) se estudió la presencia de 33 ARG en muestras de suelo dedicado a la cosecha, siendo este gen el segundo más predominante. Además, en Ichola et al. (2021) se detectó *bla*_{TEM} en un 46% de los aislados Gram negativos, y *bla*_{SHV} en un 24%. Sin embargo, en Perera et al. (2022) sí que se detectó el gen *bla*_{CMY-2} en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

En cuanto a la muestra de origen, no se detectó ningún ARG en cepas aisladas a partir de lechuga, ya que solo se consiguió aislar una, con las características requeridas en la presente investigación, por lo que se debería aumentar el tamaño de la muestra. Con respecto a los 3 vegetales restantes, en proporción, se detectaron más ARG en espinaca (33,3% de aislados a partir de esta), seguido de fresa (23,5% de las cepas con este origen), y de col (13,6% de aislados).

No dejar de mencionar la presencia de una banda inespecífica cercana a *bla*_{CMY-2} en EF91M-4, y EF91M-5, ambos *Acinetobacter* spp. aislados de fresa. Aunque aparece muy cercana a la banda correspondiente a *bla*_{CMY-2} no se puede decir que corresponda a dicho gen. Seguramente se deba a una amplificación inespecífica.

6. CONCLUSIONES

La detección de unos valores adecuados para microorganismos viables aerobios mesófilos, pero elevados para coliformes indican una calidad sanitaria óptima de los productos analizados, pero no aseguran la ausencia de patógenos o sus toxinas, por lo que su consumo se puede considerar seguro, siempre que se realicen unas correctas prácticas de lavado antes del mismo.

La detección de *E. coli* en las muestras con elevados valores de coliformes, evidencia una relación entre la carga coliformes totales y la probabilidad de encontrar este microorganismo, ya que es un tipo de coliforme. La presencia de coliformes en las hortalizas, pero su ausencia en fresas podría estar relacionado con el contacto directo de los vegetales con el suelo, recomendándose un correcto lavado y eliminación de las hojas exteriores previo a su consumo en crudo.

El hecho de haber identificado los aislados tanto por secuenciación del gen 16S ARNr como por las pruebas bioquímicas miniaturizadas API 20E, permite compararlos y concluir que el método molecular es mucho más preciso que el bioquímico, ya que solo una tercera parte se identificaron como microorganismos del mismo género por ambos métodos; por tanto, se debería recurrir a la secuenciación cuando sea posible como método de identificación.

La mayoría de las cepas aisladas se identificaron como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp., lo que supone un riesgo en Salud Pública por ser patógenos oportunistas, clasificados en el grupo de prioridad crítica en la lista elaborada por la OMS de bacterias resistentes a antibióticos.

La detección resistencia a penicilinas en el 97,7 % de los aislados indica que, a pesar de haber hecho una búsqueda dirigida para seleccionar bacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes, no se ha impedido la coselección del resto de antibióticos estudiados.

La detección de ARG en cepas, pero no en muestras diluidas en APT sin antibióticos ni en las muestras procedentes del pre-enriquecimiento en APT suplementada con antibióticos (cefotaxima y vancomicina), lleva a concluir que la dilución es demasiado elevada como para alcanzar el límite de detección de dichos genes; se deberían concentrar más las muestras para ver si es posible amplificar alguno de los genes estudiados.

La baja prevalencia de los genes de resistencia estudiados lleva a pensar que es posible que las cepas detectadas contengan algún gen de resistencia a β -lactámicos diferente a los estudiados, ya que sí manifestaron resistencia a β -lactámicos en el ensayo de disco-placa; por esta razón, se debería probar más genes relacionados con la resistencia a estos antimicrobianos para asegurar la detección molecular de los mismos.

La detección de ARG en microorganismos clasificados como patógenos oportunistas, causantes de infecciones nosocomiales, junto a la detección de un 25,6 % de aislados multirresistentes a antibióticos, supondría una mayor complejidad a la hora de tratar las infecciones causadas, ya que el número de antibióticos efectivos se vería reducido.

Este trabajo, junto estudios anteriores, refleja el riesgo que conlleva el consumo de los vegetales de hoja verde, consumidos en crudo, y las fresas sin lavar, ya que pueden servir de reservorio de microorganismos multirresistentes. Además, la presencia de genes de resistencia a antibióticos es una problemática que se puede extender a toda la cadena alimentaria mediante la transferencia horizontal de genes. Esta transferencia permitiría que esos ARG se manifestaran

en otras bacterias de cualquier especie, dificultando el tratamiento de infecciones causadas por dichos microorganismos.

Este proyecto apoyado por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación, beca PID2019-470 105691RB-I00.

BIBLIOGRAFÍA

- (CDC) Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *CDC's OutbreakNet Foodborne Outbreak Online Database*. Retrieved from <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>
- (EC) European Commission. (2017). *A European One Health action plan against antimicrobial resistance (AMR)*. Retrieved from https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf
- (ECDC) European Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, second update*. Stockholm: ECDC. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/carbapenem-resistant-enterobacteriaceae-risk-assessment-rev-2.pdf>
- (EFSA) European Food Safety Authority. (2013). *European Union Summary Reports*. Retrieved from www.efsa.europa.eu/en/zoosesdocs/zoosescomsumrep
- (WHO) World Health Organization. (2015). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Geneva. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>
- (WHO) (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*.
- (WHO) (2019, Octubre 1). *WHO releases the 2019 AWaRe Classification Antibiotics*. Retrieved from <https://www.who.int/news/item/01-10-2019-who-releases-the-2019-aware-classification-antibiotics>
- Abadías, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 121-129.
- Abdel-Kader, H., & Abdel-Moein, S. (2022). Retail chicken giblets contaminated with extended-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant *Salmonella enterica* carrying bla_{CMY-2}. *Veterinary World*, 15(5), 1297-1304.
- Alexander, D. C., Fitzgerald, S. F., DePaulo, R., Kitzul, R., Daku, D., Levett, P. N., & Cameron, A. D. (2016). Laboratory-acquired infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exposed by whole-genome sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 54(1), 190-193. doi:10.1128/JCM.02720-15
- Al-Hharousi, Z., Guizani, N., Al-Sadi, A., & Al-Bulushi, I. (2019). Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of their Amp^C β-Lactamases. *Journal of Food Protection*, 1857-1863.
- Allen, K., Kovacevic, J., Cancarevic, A., Wood, J., Xu, J., Gill, B., . . . Mesak, L. (2013). Microbiological survey of imported produce available at retail across Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 135-142.
- Appel, T., Quijano-Martínez, N., De La Cadena, E., Mojica, M., & Villegas, M. (2021). Microbiological and Clinical Aspects of *Raoultella* spp. *Frontiers in Public Health*, 9, 686789. doi:10.3389/fpubh.2021.686789
- Ashbolt, Améxquita, Backhaus, Borriello, & Brandt. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and. *Environmental Health Perspectives*, 112(9), 993-1001.
- Ashbolt, N., Améxquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K., Collignon, P., . . . Snape, J. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*, 121(9), 993-1001. Retrieved from 10.1289/ehp.1206316

- Badosa, E., Trias, R., Parés, D., Pla, M., & Montesinos, E. (2013). Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalized plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 605-611.
- Bui, T., & Preuss, C. (2021, January). *Cephalosporins*. (StatPearls Publishing) Retrieved from NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev*, *39*(1), 81-95.
- CAECV. (2020). *Informe del Sector Ecológico de la Comunitat Valenciana 2020*. Retrieved from <https://www.caecv.com/wp-content/uploads/2021/05/Informe.pdf>
- Callejón, R., Rodríguez-Naranjo, I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M., & Troncoso, A. M. (2015). Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: Trends and causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, *12*(1), 32-38. doi:10.1089/fpd.2014.1821
- CDC. (2021). *One Health Basics | One Health | CDC*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
- CDC. (2021, June 16). *Preguntas y respuestas sobre el uso de antibióticos*. Retrieved junio 15, 2022, from <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/should-know.html>
- Charles, N., Na-Jung, C., Myung-Sub, C., & Deog, H. (2018). Bacteriological quality of vegetables from organic and conventional production in different areas of Korea. *Journal of Food Protection*, *77*(8), 1411-1417.
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol*, *2*, 241-249.
- Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science & Technology*, *96*(1), 27-38. doi:<https://doi.org/10.1007/s13594-015-0235-4>
- Chiang, Y., Penadés, J., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: the new and noncanonical. *PLoS Pathog*, *15*(8), e1007878.
- Delaquis, P., Bach, S., & Dinu, L. D. (2007). Behavior of Escherichia coli O157:H7 in leafy vegetables. *Food Prot.*, *70*, 1966–1974. doi:10.4315/0362-028X-70.8.1966
- Džidić, S., Šušković, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology & Biotechnology*, *46*(1).
- EC. (2003). *Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament* . 268.
- EU Parliament. (2018). *Agricultura ecológica en la UE: nuevas reglas más estrictas (infografía)*. Retrieved from <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/society/20180404STO00909/agricultura-ecologica-en-la-ue-nuevas-reglas-mas-estrictas-infografia>
- European Commission. (2019). *Organics at a glance*. Retrieved from https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/organic-farming/organics-glance_en
- FAO. (2009). *The State of Food and Agriculture: Livestock in the Balance (Food and Agriculture Organization of the United Nations)*. Roma, Italia. Retrieved from www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf

- Hagen-Zanker, J., Morgan, J., & Meth, C. (2011). South Africa's Social Security System: Expanding Coverage of Grants and Limiting Increases in Inequality. *Overseas Development Institute*.
- Harhoura, K. (2012). Survey of hygiene in ovine slaughterhouses of Algiers region by bacteriological analysis of carcasses. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6, 4722-4726.
- Hauck, C., Cober, E., Richter, S., Perez, F., Salata, R., & Kalayjian, R. (2016). Spectrum of excess mortality due to carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2016, 513.
- Ichola, O., Dougnon, V., Koudokpon, C., Agbankpe, A., Deguenon, E., Ayena, A., & Soclo, H. (2021). Assessment of the Bacterial Pollution and Detection of Antibiotic Resistance Genes in Benin: Case of the Hydrographic Channel Complex Cotonou-Nokoué Lake. *Environ Public Health*. doi:10.1155/2021/6664816
- Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 6420.
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300-305. doi:https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Katz, L., & Baltz, R. (2016). Natural product discovery, past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 4(2-3), 155-176.
- Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 559-566.
- Kuan H., R. Y. (2017, Julio). Comparison of the microbiological quality and safety between conventional and organic vegetables sold in Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01433
- Kuan, C. H., Rukayadi, Y., Ahmad, S. H., Wan Mohamed Radzi, C., Thung, T. Y., Premarathne, J., . . . Mohd Fadzil, S. N. (2017). Comparison of the Microbiological Quality and Safety between Conventional and Organic Vegetables Sold in Malaysia. *Frontiers in microbiology*, 8, 1433. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01433
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, 115-175.
- Liu, B. T., Zhang, X. Y., Wan, S. W., Hao, J. J., Jiang, R. D., & Song, F. J. (2018, June). Characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in ready-to-eat vegetables in China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1147. doi:10.3389/fmicb.2018.01147
- Luby, E., Ibekwe, A., Zilles, J., & Pruden, A. (2016). Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance. *Journal of Environmental Quality*, 441-453.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., . . . Hindler, J. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.
- Magkos, F., Arvaniti, F., & Zampelas, A. (2006). Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Food Sci. Nutr.*, 46, 23-56. doi: 10.1080/10408690490911846
- McInnes, R., McCallum, G., Lamberte, L., & Schaik, W. (2020). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 53, 35-43.

- Misner, S., & Armstrong Florian, T. (2013, Agosto). Organically Grown Foods versus No Organically Grown Foods.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., & Diez-Gonzalez, F. (2004). Preharvest evaluation of coliforms, Escherichia coli, Salmonella, and Escherichia coli (O157:H7) in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection*, 67(5), 894-900.
- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A., Buesing, K., & Diez-Gonzalez, F. (2006). Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1928-1936.
- Mutuku, C., Melegh, S., Kovacs, K., Urban, P., Virág, E., Heninger, R., . . . Gazdag, Z. (2022). Characterization of β -Lactamases and Multidrug Resistance Mechanisms in Enterobacterales from Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant. *Antibiotics*, 11(6), 776. doi:10.3390/antibiotics11060776.
- Newman, D., & Cragg, G. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263-272. doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003
- Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., Anguera, M., Gatiús, F., & Abadias, M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 679-684.
- Orhan-Yanikan, E., da Silva-Janeiro, S., Ruiz-Rico, M., Jiménez-Belenguer, A. I., Ayhan, K., & Barat, J. M. (2019). Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. *Food Control*, 101, 29-38. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.035
- Osman, E., Nagwa, E., Emad, A., Al-Hassan, L., & Mukhtar, M. (2020). Comparing conventional, biochemical and genotypic methods for accurate identification of Klebsiella pneumoniae in Sudan. *Access Microbiol*, 2(3). doi: 10.1099/acmi.0.000096
- Pascual, M. R., & Calderón, V. (1999). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid, España: Agapea Libros.
- Perera, P., Gamage, S., de Silva, H., Jayatileke, S., de Silva, N., Aydin, A., . . . EM., C. (2022). Phenotypic and genotypic distribution of ESBL, AmpC β -lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in community acquired (CA-UTI) and hospital acquired urinary tract infections (HA-UTI) in Sri Lanka. *J Glob Antimicrob Resist*. Retrieved from 10.1016/j.jgar.2022.05.024
- Pikkemaat, M., Yassin, H., van-der-Fels-Klerx, H., & Berendsen, B. (2016). *Antibiotic Residues and Resistance in the Environment*. Wageningen UR, Wageningen, Netherlands.: RIKILT Report 2016.009. doi:https://doi.org/10.18174/
- SCF. (2002). *Risk profile on the microbiological contamination of fruits*. EU, Scientific Committee on Food. Retrieved from . http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf
- Shell, W. S., Sayed, M. L., Allah, F. M., Elzahraa, F., Gamal, M., Khedr, A. A., . . . Ali, M. (2017). Matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry as a reliable proteomic method for characterization of Escherichia coli and Salmonella isolates. *Vet World*, 10(9), 1083-1093.
- Shia, W., Liua, Y., Lia, J., Zhangb, H., Shic, R., Chena, J., & Lia, H. (2020). Distribution pattern of antibiotic resistance genes and bacterial community in agricultural soil samples of Wuliangshuai watershed. China. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106884.

- Strauch, D. (1991). Survival of microorganisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*(10), 816-846.
- Sykes, P. (2014). Chapter 8 - Antibacterial Drugs. In W. Saunders, *Canine and Feline Infectious Diseases* (pp. 66-86). Retrieved from <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00008-9>.
- Tischendorf, J., de Avila, R., & Safdar, N. (2016). Risk of infection following colonization with carbapenem resistant Enterobacteriaceae: A systematic review. *Am J Infect Control.*, 44(5), 539-543.
- Waksman, S., Schatz, A., & Reynolds, D. (2010). Production of antibiotic substances by actinomycetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1213, 112-124.
- Yoneyama, K. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 70, 60-75.

ANEXO

A. Recuento total de microorganismos indicadores

Tabla A.1: Recuento total de los microorganismos indicadores en UFC/g: viables, coliformes totales y E. coli

| Código | Muestra | Viables (UFC/g) | Coliformes totales (UFC/g) | E.coli (UFC/g) |
|--------|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------|
| EF58 | Espinaca | 2,29E+07 | 1,4E+05 | 0,0E+00 |
| EF59 | Lechuga | 2,99E+08 | 1,6E+05 | 0,0E+00 |
| EF60 | Fresa | 2,40E+02 | 3,5E+02 | 0,0E+00 |
| EF61 | Lechuga | 1,66E+06 | 4,5E+05 | 4,00E+03 |
| EF62 | Lechuga (roble) | 3,90E+06 | 1,1E+07 | 2,50E+03 |
| EF63 | Fresa | 3,97E+04 | 1,0E+02 | 0,0E+00 |
| EF64 | Col repollo | 7,40E+04 | 7,0E+03 | 0,0E+00 |
| EF65 | col lombarda | 4,10E+03 | 1,8E+04 | 0,0E+00 |
| EF66 | Espinaca | 1,81E+07 | 7,7E+05 | 5,00E+03 |
| EF67 | col lombarda | 3,34E+05 | 4,5E+04 | 0,00E+00 |
| EF68 | Col repollo | 1,68E+07 | 6,8E+04 | 0,00E+00 |
| EF69 | Espinaca | 1,34E+07 | 2,8E+07 | 5,20E+06 |
| EF70 | Col repollo | 1,65E+06 | 3,4E+05 | 0,00E+00 |
| EF71 | col lombarda | 1,15E+05 | 7,0E+02 | 0,00E+00 |
| EF72 | Espinaca | 4,56E+07 | 2,2E+06 | 0,00E+00 |
| EF73 | Col repollo | 1,00E+06 | 1,0E+04 | 0,00E+00 |
| EF74 | col lombarda | 6,00E+03 | 1,0E+04 | 0,00E+00 |
| EF75 | Espinaca | 2,75E+06 | 2,7E+05 | 0,00E+00 |
| EF76 | col lombarda | 3,75E+04 | 1,5E+03 | 0,00E+00 |
| EF77 | Col repollo | 2,45E+05 | 4,5E+02 | 0,00E+00 |
| EF78 | col lombarda | 9,15E+02 | 3,0E+03 | 0,00E+00 |
| EF79 | FRESA conv | 1,40E+02 | 0,0E+00 | 0,00E+00 |
| EF80 | fresa | 3,50E+04 | 6,50E+02 | 0,00E+00 |
| EF81 | lechuga | 3,15E+06 | 5,50E+04 | 0,00E+00 |
| EF82 | fresa | 5,00E+04 | 1,00E+02 | 0,00E+00 |
| EF83 | espinaca | 1,15E+06 | 2,50E+05 | 0,00E+00 |
| EF84 | col lombarda | 6,55E+04 | 5,00E+03 | 0,00E+00 |
| EF85 | fresa | 6,50E+03 | 2,00E+02 | 0,00E+00 |
| EF86 | espinaca | 3,90E+06 | 2,05E+06 | 0,00E+00 |
| EF87 | col rizada | 3,15E+06 | 2,60E+05 | 0,00E+00 |
| EF88 | fresa | 3,90E+05 | 2,90E+05 | 0,00E+00 |
| EF89 | lechuga roble | 2,20E+07 | 1,23E+07 | 2,50E+05 |
| EF90 | Col repollo | 5,70E+06 | 2,45E+05 | 0,00E+00 |
| EF91 | fresa | 8,55E+04 | 6,30E+03 | 0,00E+00 |
| EF92 | espinaca | 9,40E+07 | 5,50E+06 | 0,00E+00 |
| EF93 | col lombarda | 1,00E+05 | 9,00E+04 | 0,00E+00 |
| EF94 | fresa | 6,10E+04 | 9,50E+03 | 0,00E+00 |
| EF95 | col lombarda | 2,10E+05 | 3,35E+03 | 0,00E+00 |
| EF96 | fresa | 2,25E+05 | 7,50E+02 | 0,00E+00 |
| EF97 | col | 4,17E+06 | 1,00E+03 | 0,00E+00 |
| EF98 | col lombarda | 8,75E+05 | 7,50E+02 | 0,00E+00 |
| EF99 | fresa | 1,99E+07 | 1,40E+03 | 0,00E+00 |

B. Resultados de la identificación molecular de aislados

Tabla B. 1. Resultados de la identificación molecular de las cepas identificadas como *Acinetobacter baumannii* por tiras API 20E

| Aislado | ID de la solicitud | Identificación | (%) | Acceso |
|----------|-----------------------------|---|---------|--|
| EF69SC-2 | 97UD4NJT013 | <i>Pseudomonas putida</i> cepa SG 5 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 97,87% | gi 1158499428 KY750243.1 |
| EF69M-3 | 97U2A9Y2013 | <i>Acinetobacter pittii</i> cepa AB17H194 cromosoma, genoma completo | 92,45% | gi 1751094453 CP040911.1 |
| EF70M-5 | 97XEE92M016 | <i>Enterobacter cancerogenus</i> cepa MPS1416S | 100% | gi 1855725917 MT612440.1 |
| EF72M-4 | 97Z33PTY016 | <i>Acinetobacter baumannii</i> aislado BSA 40 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 97,58% | gi 1622984671 MK824869.1 |
| EF74SC-1 | 97UGJCTZ013 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> cepa GDLB-46 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 91,80% | gi 1616230209 MK791720.1 |
| EF74SC-3 | 97VWSDW1013 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> cepa Sneb530 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 100,00% | gi 1783758530 MN826157.1 |
| EF76SC-5 | 97UHMS71013 | <i>Pseudomonas</i> sp. DGC-2 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 97,76% | gi 300675907 HM347049.1 |
| EF79M-2 | 97YC89HE013 | <i>Pseudomonas</i> sp. Cepa 102515 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 99,35% | gi 1587660348 MK610450.1 |
| EF79M-3 | 97UNG5RH013 | <i>Pseudomonas reinekei</i> cepa SN8 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 99,44% | gi 485477312 KC790310.1 |
| EF81SC-5 | AGK7396T013 | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 100% | gi 2240425577 ON544022.1 |
| EF84SC-5 | 97W2UXE4013 | <i>Pseudomonas</i> sp. SWI7 cromosoma, genoma completo | 72,38% | gi 1685755910 CP040930.1 |
| EF87SC-3 | 97UU7UXE013 | <i>Pseudomonas</i> sp. Cepa HBUM206424 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 99,51% | gi 1847283283 MT540518.1 |
| EF91M-4 | 97UVR98A013 | <i>Acinetobacter</i> sp. C1(2013(gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 99,82% | gi 583831314 KF590559.1 |
| EF91M-5 | 97VTYDX8016 | <i>Acinetobacter</i> sp. C1(2013(gen 16S RNAr, secuencia parcial | 99,67% | gi 583831314 KF590559.1 |
| EF93SC-3 | 97W7DBEJ016 | <i>Pseudomonas reidholzensis</i> cepa D98_SO4R gen 16S RNAr, secuencia parcial | 99,78% | gi 1633436717 MK883197.1 |
| EF95M-1 | 97WA4YZC013 | <i>Acinetobacter</i> sp. Cepa Gm028 gen 16S RNAr, secuencia parcial | 100% | gi 1337002893 MG871198.1 |

Tabla B. 2. Resultados de secuenciación de los aislados restantes

| Aislado | Identificación API | ID solicitud | Identificación | (%) | Acceso |
|----------|--|-----------------------------|--|--------|--|
| EF63SC-1 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i> (85'3%) | ABCAH3HM016 | <i>Raoultella terrigena</i> cepa D56_MA5R gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1633436682 MK883162.1 |
| EF63SC-2 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i> (81'1%) | ABCJWVX0013 | <i>Raoultella terrigena</i> cepa NCTC13098 ensamblaje del genoma, cromosoma 1 | 99,81% | gi 1531751523 LR131271.1 |
| EF63SC-3 | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i> (85'3%) | ABD6XH3J013 | <i>Raoultella terrigena</i> cepa D56_MA5R gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 99,81% | gi 1633436682 MK883162.1 |
| EF64SC-1 | <i>Yersinia enterocolitica</i> (97'9%) | ABD97DAR013 | <i>Enterobacter</i> sp. Cepa MD10F gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1680430374 MN049924.1 |
| EF69SC-3 | <i>Klebsiella oxytoca</i> 16,3% | ABE2SHCN01R | <i>Pantoea ananatis</i> cepa FDAARGOS_680 cromosoma, genoma completo | 99,63% | gi 1860091948 CP054912.1 |
| EF70M-2 | <i>Enterobacter cloacae</i> (95,4%) | AW3074RK013 | <i>Enterobacter ludwigii</i> cepa ESM19 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1702088840 MN173463.1 |
| EF70M-4 | <i>Enterobacter cloacae</i> (95,4%) | AW02E7CZ01R | <i>Enterobacter</i> sp. Cepa NOD9 gen 16S ARN ribosómico secuencia parcial | 98,22% | gi 1391915696 MH392323.1 |
| EF71SC-4 | <i>Enterobacter cloacae</i> (97,7%) | AW03HHGH01R | <i>Pseudomonas</i> sp. Cepa Str-1a gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 99,74% | gi 1615643301 MK789741.1 |
| EF72SC-2 | <i>Enterobacter cloacae</i> (97,7%) | AW04JUMZ01R | <i>Enterobacter hormaechei</i> cepa LS36 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1841784216 MT470964.1 |

| | | | | | |
|-----------|--|------------------------------|---|--------|--|
| EF72SC-3 | <i>Enterobacter cloacae</i> (97,7%) | AW329U2V016 | <i>Enterobacter hormaechei</i> cepa LS36 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1841784216 MT470964.1 |
| EF73SC-2 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | AW05K6G101R | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa JM11 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1853410410 MT605300.1 |
| EF73SC-4 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | AW06D68B01R | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa UCD18.5 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1005392155 KU851240.1 |
| EF73SC-5 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | AW07E3TH01R | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa 8 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 99,77% | gi 2231294500 ON357998.1 |
| EF74M-1 | <i>stenotrophomonas maltophilia</i> (96,7%) | AW08D7XY013 | <i>Stenotrophomonas</i> sp. NTA gen 16S RNA ribosomal, secuencia parcial | 99,36% | gi 1622984744 MK824942.1 |
| EF77M-3 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>rhinoscleromatis</i> o <i>ozanae</i> | AW0F59DY01R | <i>Pseudomonas psyfthrotolerans</i> gen 16S ARN ribosómico, aislado 0911TES5E3 | 99,78% | gi 762217833 LN774322.1 |
| EF79M-1 | <i>Pasteurella pneumotropica</i> (66,3%) | AW0G34JF01R | <i>Pseudomonas</i> sp. Cepa 102515 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 99,68% | gi 1587660348 MK610450.1 |
| EF79M-3.2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>rhinoscleromatis</i> o <i>ozanae</i> | AW0GZTW9013 | <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> cepa 2.1 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1811132577 MT089709.1 |
| EF84M-1 | <i>Serratia ficaria</i> (98'7%) | AW0UHAK0016 | <i>Pseudomonas</i> sp. Cepa SK 09 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 99,75% | gi 1128613278 KY427439.1 |
| EF84M-4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>rhinoscleromatis</i> (89.6%) | AXNWCYAN7016 | <i>Pseudomonas</i> sp. Cepa HBUM200048 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 97,74% | gi 1193729528 KY945802.1 |

| | | | | | |
|----------|---|-----------------------------|---|--------|--|
| EF84M-5 | <i>Serratia ficaria</i> (96,9%) | AW0VB7W9016 | <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> cepa DHG28 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1784846536 MN833623.1 |
| EF87SC-2 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99,3%) | AW0XAHD201R | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa S1-4 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 99,73% | gi 1778155319 MN732977.1 |
| EF87SC-4 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (71,8%) | AW0YAT4B01R | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa SM28 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1838556484 MT436715.1 |
| EF87SC-5 | <i>Salmonella ssp</i> (84,5%)// <i>Citrobacter freundii</i> (7,3%) | AXNYNMN6013 | <i>Pseudomonas putida</i> cepa YC-AE1 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 96,40% | gi 1540304109 MK318658.1 |
| EF88SC-4 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (76,1%) | AW10D8KJ013 | <i>Pseudomonas sp.</i> Cepa YL11 gen 16S ARN ribosómico, secuencia parcial | 99,80% | gi 1337931694 MG877640.1 |
| EF91M-1 | <i>Serratia ficaria</i> | AW11901S013 | <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> cepa 2.1 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1811132577 MT089709.1 |
| EF91M-2 | <i>Serratia ficaria</i> | AW12DXTG016 | <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> cepa 2.1 gen 16S ARN ribosomal, secuencia parcial | 100% | gi 1811132577 MT089709.1 |
| EF91M-3 | <i>Serratia ficaria</i> | AW35KXES016 | <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> cepa CS51 cromosoma, genoma completo | 99,55% | gi 1690455242 CP021645.1 |