



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

Caracterización de la resistencia fenotípica y presencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y carbapenémicos en bacterias aisladas de productos agrícolas frescos cultivados en Valencia.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: González Pampliega, Claudia

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a externo: Moreno Trigos, M^a Yolanda

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural



iiama

Instituto de Ingeniería del
Agua y Medio Ambiente

Caracterización de la resistencia fenotípica y presencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y carbapenémicos en bacterias aisladas de productos agrícolas frescos cultivados en Valencia.

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Grado en Biotecnología

Autor/a: Claudia González Pampliega

Tutor/a académico: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Tutor/a externo: Yolanda Moreno Trigos

Curso académico: 2023/2024

Valencia, junio de 2024

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA FENOTÍPICA Y PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS Y CARBAPENÉMICOS EN BACTERIAS AISLADAS DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS FRESCOS CULTIVADOS EN VALENCIA.

Resumen:

En los últimos años ha aumentado el consumo de verduras de cultivo ecológico por la creencia popular de que son más saludables, al ser cultivados sin usar fertilizantes ni pesticidas sintéticos, generalmente empleado estiércol. Sin embargo, el consumo de vegetales crudos puede suponer un riesgo para la seguridad alimentaria, ya que pueden ser reservorios de bacterias resistentes a antibióticos (ARB) que pueden llegar al consumidor a través de la cadena alimentaria, y provocar diversas infecciones más complicadas de tratar, así como diseminar sus genes de resistencia a antimicrobianos (ARG) a otras bacterias. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la dispersión de ARB como una de las principales amenazas para la salud pública hoy en día. Asimismo, denomina de importancia crítica las Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y a carbapenémicos, por ser productoras de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) y carbapenemasas, que disminuyen la efectividad de estos antibióticos.

Este trabajo busca detectar bacterias Gram negativas, fundamentalmente Enterobacterias, resistentes a antibióticos carbapenémicos o cefalosporinas de tercera generación en vegetales frescos de consumo crudo cultivados en Valencia. Se estudiaron muestras de lechuga, kale, espinaca, rúcula y chufa, de cultivo ecológico y convencional, donde se aislaron bacterias potencialmente resistentes que fueron identificadas mediante MALDI-TOF. Se aislaron 51 cepas, ninguna perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, pero todas patógenas oportunistas con un impacto creciente en el ámbito hospitalario. Se analizaron sus patrones de resistencia mediante antibiograma, siendo los antibióticos carbapenémicos los que más resistencias propiciaron, especialmente meropenem, mientras que ceftazidima fue el que mayor sensibilidad mostró. Además, se encontró una pequeña diferencia entre la prevalencia de aislados resistentes en cultivo ecológico y convencional.

La gran mayoría de aislados eran productores de ESBL, lo que muestra el potencial riesgo de las bacterias aisladas en caso de infección. Se buscó también detectar ciertos ARG de tipo *bla* mediante PCR y electroforesis, pero todos los resultados obtenidos fueron negativos, por lo que es necesario incrementar la cantidad de ARG estudiados y emplear otros métodos de detección más sensibles en futuros estudios. Los resultados obtenidos han demostrado que, en efecto, los vegetales pueden ser un reservorio de ARB oportunistas con numerosas resistencias y genes codificantes de ESBL, lo que puede suponer un peligro especialmente para personas inmunocomprometidas. Por ello, es necesaria la vigilancia de estas ARB y la implementación de medidas que mejoren la situación actual y la perspectiva de futuro.

Este trabajo se fundamenta en los ODS 2 (hambre cero), 3 (salud y bienestar), 12 (producción y consumo responsables) y 13 (acción por el clima).

Palabras clave: cultivo ecológico, resistencia a antibióticos, ARB, β -lactámicos, genes de resistencia

Autora: Claudia González Pampliega

Tutora académica: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Tutora externa: Yolanda Moreno Trigos

CHARACTERIZATION OF PHENOTYPIC RESISTANCE AND RESISTANCE GENES TO β -LACTAM AND CARBAPENEM ANTIBIOTICS IN BACTERIA ISOLATED FROM FRESH PRODUCE GROWN IN VALENCIA.

Abstract:

The consumption of organically grown vegetables has increased recently due to the popular belief that they are healthier, as they are cultivated without synthetic fertilizers or pesticides, generally using manure. However, consuming raw vegetables can threaten food safety, as they can be reservoirs of antibiotic-resistant bacteria (ARB) that can reach consumers through the food chain, causing various infections that are more difficult to treat, and can also spread their antimicrobial resistance genes (ARG) to other bacteria. For this reason, the World Health Organization (WHO) considers the spread of ARB as one of the major concerns to public health nowadays. They behold third-generation cephalosporin- and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae to be critically important because they produce extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and carbapenemases, which reduce the effectiveness of these drugs.

This essay seeks to detect Gram-negative bacteria, primarily Enterobacteriaceae, resistant to carbapenem or third-generation cephalosporin antibiotics in fresh raw vegetables cultivated in Valencia. Samples of lettuce, kale, spinach, arugula, and tiger nuts from both organic and conventional farming were studied. Potentially resistant bacteria were isolated and identified by MALDI-TOF. A total of 51 strains were isolated, none belonging to the Enterobacteriaceae family, but all being opportunistic pathogens with a growing impact in the hospital environment. Their resistance patterns were analyzed using antibiograms, and carbapenem antibiotics were the most resisted, especially meropenem, while ceftazidime showed the highest sensitivity. Additionally, a slight difference was found between the prevalence of resistant isolates in organic and conventional farming.

Most of the isolates were ESBL producers, highlighting the potential risk of the isolated strains in case of infection. Certain *bla*-type ARGs were also searched using PCR and electrophoresis, despite all results being negative, suggesting the need to increase the number of ARGs studied and to use more sensitive detection methods in future studies. These results indicate that vegetables can be reservoirs of opportunistic ARB with numerous resistances and ESBL genes, posing a particular risk for immunocompromised individuals. Therefore, it is necessary to thoroughly monitor this ARB and implement measures to improve the current situation and future outlook.

This work is based on SDGs 2 (zero hunger), 3 (good health and well-being), 12 (responsible consumption and production) and 13 (climate action).

Keywords: organic culture, antimicrobial resistance, ARB, β -lactam, antimicrobial resistance genes

Writer: Claudia González Pampliega

External tutor: Yolanda Moreno Trigos

Academic tutor: Ana Isabel Jiménez Belenguer

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo al grupo de investigación de “Biodiversidad microbiana del ciclo del agua” del IIAMA por permitirme realizar este proyecto con ellos, enseñándome todo lo necesario sobre microbiología, y ayudándome en todo momento. Infinitas gracias a todos: Jose Luis, Inma, Laura, Yolanda, y Alba. Y en especial a Carla, por haber sido mi compañera de laboratorio durante estos meses y haberme ayudado en todo con una paciencia infinita y siempre con una sonrisa, incluso cuando las cosas no salían tan bien. Muchas gracias también a Ana, por tutorizarme y echarme una mano cuando lo necesitaba en este gran proceso.

Gracias a todas las personas que me han acompañado en este viaje a lo largo de estos cuatro (o cinco) años. Aunque ahora cada uno tenga su propio camino, siempre nos quedará todo lo que vivimos juntos: almuerzos en la uni, risas en los laboratorios, descansos de biblioteca, comidas en el césped, pero también las cenas, las fiestas y los viajes. Gracias a todo eso hemos llegado a donde estamos. No cambiaría nuestros “tiempos mozos” por nada, con vosotros se hizo más liviano el viaje.

Gracias en especial a Glori, por estar ahí desde el primer día hasta el último de esta aventura. Has sido mi fiel compañera de apuntes y trabajos, pero también mi apoyo cuando creía que no podía y mi salvavidas en mil ocasiones; en parte el título te lo debo a ti. Y también gracias a Adri, por haber estado este tiempo junto a mí, escuchándome, ayudándome, apoyándome, y alentándome siempre a seguir hacia adelante; has creído en mí casi más que yo. Todo es más fácil a tu lado.

Quiero agradecer a mis padres el haberme dado siempre la libertad de decidir sobre mi vida y mi futuro, y por darme la oportunidad de estudiar lo que quise. Gracias por vuestra confianza y vuestro apoyo incondicional incluso cuando no tenía claro si esto era para mí, ¡al final lo he conseguido! Gracias también a toda mi familia, a Miguel por ser mi compañero de vida y sacarme siempre una sonrisa, a mi abuela, y en especial a mi abuelo, sé que estarías orgulloso de mí.

Y por último, gracias a la Claudia de 17 añitos que decidió meterse en esta aventura sin tener ni idea de lo que le esperaba, y que siguió siempre adelante a pesar de todo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. CULTIVO ECOLÓGICO	1
1.1. Definición y normativa	1
1.2. Importancia del cultivo y consumo ecológico	1
1.3. Diferencias con respecto al cultivo convencional	3
2. SEGURIDAD ALIMENTARIA EN EL CONTEXTO DE “ONE HEALTH”	3
2.1. Seguridad alimentaria	3
2.2. Enfermedades de transmisión alimentaria	4
2.3. Patógenos críticos: bacterias resistentes a antibióticos	5
2.4. Concepto de <i>One Health</i> e implicación contra las resistencias antimicrobianas	6
2.5. Objetivos de Desarrollo Sostenible	6
3. ANTIBIÓTICOS Y SU PROBLEMÁTICA: APARICIÓN DE RESISTENCIAS	7
3.1. Tipos de antibióticos	7
3.1.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana	7
3.1.2. Antibióticos activos en la membrana plasmática	9
3.1.3. Antibióticos inhibidores de la síntesis proteica	9
3.1.4. Antibióticos que actúan sobre en el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos	10
3.1.5. Antimicrobianos que bloquean mecanismos de resistencia	10
3.2. Resistencia antimicrobiana	10
3.2.1. Factores que favorecen la aparición de resistencia	11
3.2.2. Mecanismos de resistencia	12
3.2.3. β -lactamasas y ARGs	13
3.2.4. Perspectiva de futuro	14
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. ORIGEN DE MUESTRAS VEGETALES	16
2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES	16
2.1. Aislamiento y obtención del cultivo puro	16
2.2. Estudio de la sensibilidad a antibióticos de las cepas aisladas	17
2.3. Identificación de las bacterias resistentes	18
3. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	19
3.1. Extracción y cuantificación del ADN de las cepas aisladas	19
3.2. PCR múltiple de genes de resistencia a β -lactámicos	19
3.3. Electroforesis en gel de agarosa para la detección de genes de resistencia	20

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A β -LACTÁMICOS AISLADAS DE MUESTRAS VEGETALES	21
1.1. Aislamientos de bacterias potencialmente resistentes a carbapenémicos	21
1.2. Identificación de las bacterias aisladas mediante EM MALDI-TOF	21
2. ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLADOS	25
2.1. Patrones de resistencia de los aislados	25
2.2. Estudio de la producción de ESBL de los aislados	29
3. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AISLADOS	30
V. CONCLUSIONES	33
VI. BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del dipéptido D-Alanina-D-Alanina que conforma el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, y su similitud con la estructura de los cuatro grupos que conforman los antibióticos β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos.	8
Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos moleculares que poseen las bacterias para ser resistentes a diferentes antibióticos.	12
Figura 3. Porcentaje de aislados totales procedentes de cada tipo de vegetal.	21
Figura 4. Distribución porcentual de cada especie bacteriana en el total de aislados identificados.	22
Figura 5. Proporción que representa cada especie bacteriana aislada frente al total de aislados en cada uno de los vegetales estudiados.	24
Figura 6. Distribución porcentual de cada especie o género bacteriano sobre el total de aislados en cada tipo de cultivo.	25
Figura 7. Distribución de la cantidad de aislados que presentan resistencia a cada uno de los antibióticos estudiados, ordenando los patrones de resistencia en función del número de antibióticos que contienen.	26
Figura 8. Porcentaje de los aislados de cada tipo de verdura y cultivo que presentan resistencia a al menos un antibiótico.	28
Figura 9. Electroforesis en gel para estudiar los ARG <i>bla</i> _{OXA} y <i>bla</i> _{IMP} en las muestras indicadas.	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras analizadas, incluyendo el tipo de vegetal, tipo de cultivo, y su respectivo código.	16
Tabla 2. Antibióticos empleados para el estudio de resistencias a antimicrobianos de los aislados, clasificados por grupos. Los valores se clasifican en resistentes o sensibles según el diámetro del halo de inhibición en milímetros, aplicable para diferentes géneros bacterianos.	18
Tabla 3. Genes de resistencia estudiados mediante PCR, con el correspondiente tamaño del amplicón esperado, la secuencia de los <i>primers</i> empleados y las condiciones de PCR requeridas.	20
Tabla 4. Patrones de resistencia que muestran los 51 aislados estudiados, contabilizando el número de cepas que presenta cada uno de ellos.	26

ABREVIATURAS

AMR	Resistencia a antimicrobianos (<i>AntiMicrobial Resistance</i>)
APT	Agua de Peptona Tamponada
ARB	Bacterias resistentes a antibióticos (<i>Antimicrobial-Resistant Bacteria</i>)
ARG	Genes de resistencia a antibióticos (<i>Antimicrobial Resistance Genes</i>)
ARN	Ácido RiboNucleico
C3G	Cefalosporinas de tercera generación
CAL	Ceftazidima + ácido clavulánico
CAZ	Ceftazidima
CE	Comisión Europea
CTL	Cefotaxima + ácido clavulánico
CTX	Cefotaxima
CV	Comunidad Valenciana
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
EM	Espectrometría de masas
ESBL	β -lactamasas de espectro extendido (<i>Extended-Spectrum β-Lactamases</i>)
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
IMP	Imipenem
MEM	Meropenem
MH	Agar Müeller-Hinton
mPCR	PCR múltiplex
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	Ácido N-acetilmurámico
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Proteínas fijadoras de penicilina (<i>Penicillin Binding Proteins</i>)
PBS	Salino tamponado con fosfato (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCA	Agar de recuento de bacterias (<i>Plate Count Agar</i>)
PRAN	Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos
qPCR	PCR cuantitativa
RCF	Fuerza centrífuga relativa (<i>Relative Centrifugal Force</i>)
SC	Agar mSuperCARBA
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
TBE	Tris Borato EDTA
UE	Unión Europea

I. INTRODUCCIÓN

1. CULTIVO ECOLÓGICO

1.1. Definición y normativa

La producción ecológica es una forma de gestión y producción agroalimentaria que combina mejores prácticas ambientales con el mantenimiento del bienestar animal, la biodiversidad y los recursos naturales, para obtener una producción acorde a las preferencias y filosofía de ciertos consumidores (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2024). Busca obtener alimentos empleando sustancias y procesos naturales, haciendo un uso responsable de la energía y los recursos para causar el mínimo impacto ambiental posible que garantice, además, un mercado equitativo y justo para productores y distribuidores (CE, 2024a). La agricultura ecológica implica cadenas de suministro más cortas y ofrece nuevas oportunidades a pequeños agricultores, lo que resulta en consonancia con los principios de la Unión Europea (UE) de promover prácticas sostenibles que permitan alcanzar los objetivos del Pacto Verde Europeo relativos al clima, medioambiente, transporte y agricultura (CE, 2024b; Consejo de la Unión Europea, 2024).

Para que el mercado ecológico cumpla con lo que promete, la UE establece una normativa referida a todas las fases del proceso de producción agrícola: la producción, la distribución y la comercialización de productos (CE, 2024a). Regula acerca de semillas y otros materiales de reproducción, de productos agrícolas vivos o no transformados, piensos, y productos agrícolas transformados destinados a la alimentación humana (CE, 2024c).

Para que un productor pueda comercializar sus productos como ecológicos, debe darse de alta ante el organismo de control pertinente (CE, 2024a). Los agricultores ecológicos no tienen permitido el uso de abonos sintéticos, radiaciones ionizantes, organismos modificados genéticamente (OMG) ni hormonas. A su vez, está muy restringido el uso de fertilizantes artificiales, herbicidas, plaguicidas y antibióticos, de modo que tan solo pueden emplear ciertos plaguicidas químicos aprobados por el Reglamento (UE) n.º 2018/848 sobre producción ecológica (CE, 2024b). Con el fin de mantener la fertilidad del suelo de manera natural sin necesidad de fertilizantes sintéticos, los productores ecológicos pueden poner en práctica la rotación de cultivos, el cultivo de plantas de fijación de nitrógeno y otros cultivos de abonos verdes, y también elegir variedades y técnicas que fomenten el control natural de plagas para evitar el uso de plaguicidas (CE, 2024c). De hecho, el estiércol es el fertilizante más ampliamente utilizado en cultivo ecológico (Sun *et al.*, 2019). La normativa regula también las etapas posteriores a la obtención de los vegetales, como son el almacenamiento, transformación, transporte, distribución o suministro, estableciendo que los alimentos ecológicos deben estar separados en espacio y tiempo de aquellos que no lo sean (CE, 2024c).

1.2. Importancia del cultivo y consumo ecológico

a. En la Unión Europea

La superficie dedicada a la producción ecológica en la UE fue de 15,6 millones de hectáreas en 2021, lo que supone un incremento del 4,7 % con respecto a 2020, y del 59,6 % con respecto a 2011, y se

traduce en que el 11,2 % de la superficie agrícola total de la UE se destina a agricultura ecológica (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023; Comité d'Agricultura Ecològica Comunitat Valenciana, 2022). El consumo ecológico alcanzó en 2021 los 46.665 millones de euros, y ha registrado un incremento del 190 % en los últimos 10 años, reflejando así el gran crecimiento de este mercado en los últimos años (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023). La Comisión Europea (CE), en el marco de sus estrategias sobre Biodiversidad, establece el objetivo de que en 2030 al menos el 25 % de las tierras agrícolas de la UE se utilicen para agricultura ecológica (CE, 2024b). Para fomentarlo se basa en tres pilares: estimular la demanda y garantizar la confianza de los consumidores para animar a agricultores a convertirse a la agricultura ecológica, estimular la conversión a la agricultura ecológica y aumentar la contribución de la agricultura ecológica a la sostenibilidad (CE, 2024d).

b. En España

España contaba en 2021 con 2,6 millones de hectáreas dedicadas a producción ecológica, de forma que es el séptimo país en cuanto a superficie ecológica a nivel mundial, y el segundo a nivel europeo, por detrás de Francia. La superficie empleada para cultivo ecológico en 2021 representaba casi un 11 % de la superficie agraria total utilizada en España, valor que se mantiene al alza. La mayor producción ecológica vegetal procede de hortalizas, patatas, cítricos, uva y aceituna. Teniendo en cuenta que el crecimiento en la producción ecológica ha sido superior al incremento de superficie cultivada, se muestra un incremento en la productividad de dicha superficie (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023).

De los alimentos ecológicos más comprados, destacan aquellos de origen vegetal, que supusieron el 69 % de la masa total de producción ecológica comprada en España en 2023 (ECOVALIA, 2023). De entre ellos, los más consumidos son las frutas y verduras frescas, que en conjunto representan casi el 36,5 % del consumo total de productos ecológicos. A pesar del gran dato de producción, el consumo español de productos ecológicos supone tan solo el 2,1 % del consumo mundial, lo que demuestra que España es un país principalmente exportador de este tipo de productos. De hecho, tiene un papel importante a nivel mundial en el comercio de ciertos productos ecológicos, como son los cítricos, el aceite de oliva y vino, hortalizas, cereales y frutas (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023).

c. En la Comunidad Valenciana

En 2022, la superficie ecológica certificada en la Comunidad Valenciana (CV) era de 153.774 hectáreas, tan solo un 0,18 % más que el año anterior, pero un 129 % más de superficie que en 2012. Esto demuestra que, aunque el cultivo ecológico ha sufrido un gran auge en los últimos años, sus valores están estabilizándose. Sin embargo, la CV está cerca de conseguir el objetivo europeo de dedicar al menos el 25 % de su superficie agraria útil para cultivo ecológico, pues en 2021 ya había alcanzado el 20,5 %. La facturación del sector ecológico mostró un incremento del 373 % desde 2015 hasta 2022. Al igual que ocurre con la producción española, gran parte de la producción valenciana se destina a exportaciones, y tan solo el 16 % se consume en la propia comunidad (Comité d'Agricultura Ecològica Comunitat Valenciana, 2022).

1.3. Diferencias con respecto al cultivo convencional

La preferencia de ciertos sectores de la población hacia alimentos de cultivo ecológico se produce por diversos motivos: demostrar apoyo a una industria más amable y respetuosa con el medioambiente, consumir productos que no contengan pesticidas ni otras sustancias adicionadas, y en algunas ocasiones, por la creencia popular de que estos productos contienen una mayor cantidad de nutrientes o son más beneficiosos para la salud (Misner y Armstrong Florian, 2013; Jiménez-Belenguer *et al.*, 2023).

Son escasos los estudios que han investigado si los alimentos ecológicos son más saludables y tienen algún tipo de efecto beneficioso en el organismo o en la prevención de enfermedades, de forma que no hay conclusiones sólidas al respecto. Asimismo, es complicado llevar a cabo estudios que demuestren el efecto beneficioso de alimentos ecológicos frente a los convencionales, pues existe un gran sesgo: los consumidores que tienden a consumir productos ecológicos suelen tener hábitos de vida más saludables, consumiendo más frutas, verduras y legumbres, y menos carnes. Esto dificulta conocer si los efectos beneficiosos del cultivo ecológico proceden de este, o del estilo de vida saludable que llevan quienes los consumen (Mie *et al.*, 2017).

No obstante, la gran restricción de sustancias sintéticas que se pueden usar en el cultivo ecológico hace que los productos obtenidos tengan un menor contenido en pesticidas. Un gran consumo de frutas y verduras de cultivo convencional por parte de los consumidores se traduce en un alto contenido de pesticidas en excreciones urinarias, que se ve reducido cuando el consumo es de productos de origen ecológico. Sabiendo que algunos pesticidas pueden ser peligrosos por tener efectos neurotóxicos, carcinogénicos y de disrupción endocrina, se puede considerar ventajoso el consumo de productos que contengan menores cantidades de estos productos (Mie *et al.*, 2017).

Existen distintas razones que hacen que el consumo de productos ecológicos sea aún minoritario. Según el estudio llevado a cabo por Mazur-Włodarczyk y Gruszecka-Kosowska (2022) en Polonia, los principales motivos eran la imposibilidad de adquirir productos ecológicos en el entorno cercano, su elevado precio, y la ausencia de ventajas reales con respecto al cultivo convencional. En efecto, la agricultura ecológica resulta más cara por el uso de métodos más extensivos y productos naturales, que proporcionan rendimientos inferiores y aumentan los costes de producción. El plan de acción para el desarrollo de la producción ecológica de la CE tiene esto en cuenta, y por tanto propone medidas que subsanen este inconveniente y contribuyan a la extensión del consumo de vegetales de producción ecológica (CE, 2024b).

2. SEGURIDAD ALIMENTARIA EN EL CONTEXTO DE “ONE HEALTH”

2.1. Seguridad alimentaria

Las enfermedades de transmisión alimentaria son causadas por la contaminación de los alimentos por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas en alguna de las etapas de producción, suministro o consumo, debido a contaminación ambiental o polución del agua, suelo o aire. Esto supone un gran problema de salud pública y repercute, a su vez, en la economía, por lo que es fundamental garantizar el acceso a alimentos inocuos y nutritivos de calidad (OMS, 2023a). Una forma importante de

contaminación del suelo de cultivo de vegetales es el empleo de estiércol y agua de riego contaminados con bacterias (Rico y Falomir, 2020).

Para proteger la salud humana y gestionar los posibles riesgos alimentarios, existen diferentes entidades a nivel europeo y nacional. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés *European Food Safety Authority*) colabora con el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC por sus siglas en inglés, *European Centre for Disease Prevention*) para ofrecer asesoramiento sobre enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos y para tomar decisiones a escala europea (EFSA, 2024). Así, se busca garantizar que los productos a disposición de los consumidores son seguros y no presentan riesgos para la salud.

2.2. Enfermedades de transmisión alimentaria

Las enfermedades transmitidas por alimentos están causadas por el consumo de productos alimentarios o agua contaminados por microorganismos patógenos, que penetran en el organismo a través del tracto gastrointestinal. Son una amenaza importante para la salud pública mundial, dado que en se notifican alrededor de 350.000 casos al año tan solo en la UE (EFSA, 2024). A nivel mundial, se calcula que anualmente enferma una de cada diez personas por la ingesta de alimentos contaminados, lo que deriva en más de 420.000 muertes anuales (OMS, 2023a). El 40 % de los casos se dan en niños menores de 5 años (OMS, 2024a).

Para reducir el riesgo de padecer enfermedades de transmisión alimentaria provocadas por bacterias, es necesario adoptar medidas de prevención y control en la cadena alimentaria (EFSA, 2024). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2024b) propone una guía de las “*Cinco claves para cultivar frutas y hortalizas más seguras: promover la salud mediante la disminución de la contaminación microbiana*”, donde se insta a los agricultores a: practicar una buena higiene personal, proteger los campos de la contaminación fecal por animales, emplear residuos fecales tratados, evaluar y gestionar los riesgos del agua de riego empleada, y mantener los equipos de cosecha y almacenamiento limpios. Del mismo modo, el *Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos* de la OMS busca recoger una serie de medidas que aseguren la salubridad de los alimentos. Una de las directrices incita a cocinar completamente los alimentos para eliminar los posibles patógenos presentes, mientras que, para los productos de consumo en crudo donde esto no es posible, se recomienda lavarlos adecuadamente con agua limpia (OMS, 2007). En caso de que la cocción o desinfección no sea adecuada, los patógenos pueden entrar en la cadena alimentaria y provocar infecciones.

De entre los posibles microorganismos patógenos que se pueden encontrar en alimentos, destacan *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Campylobacter*, *Yersinia* y *Listeria monocytogenes*.

Salmonella es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae que causa salmonelosis, una enfermedad gastrointestinal que, aunque generalmente es leve, puede llegar a provocar la muerte a la población de riesgo. Se caracteriza por la aparición de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos. Se transmite a través de la cadena alimentaria por alimentos contaminados procedentes de animales portadores de la bacteria, generalmente huevos, leche y carnes. Sin embargo, otra vía de transmisión pueden ser las hortalizas cultivadas en tierras con estiércol contaminado, pues la bacteria se puede transmitir por vía fecal-oral (OMS, 2024b).

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram positivo que causa listeriosis, enfermedad sistémica no muy frecuente pero sí grave que suele estar asociada al consumo de productos cárnicos preparados contaminados, así como algunos productos lácteos, ensaladas, frutas y hortalizas. Las hortalizas pueden contaminarse con esta bacteria por la contaminación del suelo o por el uso de estiércol como fertilizante. La listeriosis es especialmente peligrosa para embarazadas, ancianos y personas inmunodeprimidas. Un aspecto a destacar es que esta bacteria puede sobrevivir a bajas temperaturas y multiplicarse en condiciones de frío (OMS, 2023b).

E. coli es una bacteria Gram negativa común y generalmente inocua. Sin embargo, algunas cepas producen una toxina, Shiga, que puede causar enfermedades graves y potencialmente mortales como el síndrome hemolítico urémico. Estas derivan de la contaminación de carne o leche cruda, de hortalizas cultivadas con estiércol contaminado, y en ocasiones, se debe a contaminación cruzada de otros alimentos. Es más, se ha visto aumentado el número de brotes de *E. coli* asociados al consumo de frutas y verduras contaminadas con heces de animales, y se ha aislado también esta bacteria de diferentes masas de agua (OMS, 2024c).

2.3. Patógenos críticos: bacterias resistentes a antibióticos

Los antibióticos son fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias. Su uso excesivo e indebido en ciertas ocasiones en salud animal y humana ha propiciado la aparición de bacterias resistentes a antibióticos (ARB) que no responden a los tratamientos previamente efectivos (OMS, 2024a). Las ARB pueden introducirse en la cadena alimentaria y causar infecciones más difíciles de tratar y que incrementan la mortalidad en el consumidor final (OMS, 2024d). Por otra parte, pueden contribuir a la diseminación de genes de resistencia a otras bacterias al colonizar el intestino e intercambiar estos genes con las bacterias intestinales (Chelaghma *et al.*, 2021). Por ello, en 2019 la OMS declaró que la resistencia a antimicrobianos (AMR) era una de las diez amenazas principales mundiales para la salud pública (CE, 2024e).

La prevalencia de ARB de importancia crítica asociadas a la atención sanitaria sigue siendo muy alta (EFSA, 2022). Se ha observado un aumento en las tasas de resistencia a los antibióticos más comúnmente empleados en infecciones bacterianas comunes como son las infecciones urinarias, de transmisión sexual o las que desencadenan diarrea (OMS, 2024e). Se ha dado también un incremento en la resistencia a antibióticos de última línea, como es el caso de la vancomicina o los carbapenémicos, lo que tiene una gran trascendencia porque no existen muchas líneas de tratamiento alternativas a la ineficacia de estos fármacos (EFSA, 2022).

Según informan la EFSA y el ECDC, se remarca la importancia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación (C3G), de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *Salmonella* spp. resistentes a carbapenémicos, y de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación (EFSA, 2022; OMS, 2024d). En el caso de concreto de *Klebsiella pneumoniae*, que provoca enfermedades nosocomiales como la neumonía, septicemia u otros tipos de infecciones, su tratamiento de último recurso eran los antibióticos carbapenémicos; sin embargo, se han propagado cepas resistentes a estos fármacos por todo el mundo. Por tanto, es necesario el estudio

de la evolución de las resistencias y desarrollo de nuevos tratamientos para bacterias Gram negativas críticas resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación (OMS, 2024d).

La OMS publicó en mayo de 2024 la lista actualizada de patógenos prioritarios que requieren de una especial atención por la presencia de cepas resistentes a antibióticos. En ella se clasifican las diferentes bacterias en tres categorías: crítica, alta y media. Para su elaboración se tienen en cuenta las infecciones a nivel mundial y el impacto en la salud pública de cada patógeno. Los patógenos de prioridad crítica son amenazas peligrosas a nivel mundial por su resistencia a tratamientos farmacológicos y las escasas alternativas disponibles, su gran transmisibilidad y su capacidad de transmitir genes de resistencia a antibióticos (ARG) a otras bacterias. Entre los patógenos críticos se encuentran los Enterobacterales resistentes a cefalosporinas de tercera generación y Enterobacterales resistentes a carbapenémicos. Esto refleja la gran peligrosidad de dichos patógenos y la necesidad de una vigilancia exhaustiva de la evolución de sus resistencias (OMS, 2024e).

2.4. Concepto de *One Health* e implicación contra las resistencias antimicrobianas

Las enfermedades de transmisión alimentaria y la AMR son problemas prioritarios y complejos que requieren un planteamiento transversal y consolidado. De este modo, la iniciativa “*One health*” o “*Una sola salud*” de la OMS busca reunir a diferentes sectores involucrados en la salud de los humanos, animales, plantas y medioambiente para estrechar la comunicación y desarrollar programas y normativas para mejorar la salud pública mundial (OMS, 2024d). Reconoce que la salud de las personas, animales, plantas y medioambiente están estrechamente relacionados y son interdependientes, y por ello, busca equilibrar y unificar la salud global mediante medidas que repercutan en todos los sectores.

La CE adoptó en 2017 un plan de acción para abordar la problemática de la resistencia antimicrobiana desde el enfoque de *One Health: el Plan único de acción sanitaria contra la resistencia antimicrobiana*. Las medidas de la UE se han centrado en el uso racional de antibióticos, la mejora en la prevención de infecciones y el fortalecimiento de la vigilancia de las resistencias a antimicrobianos. Del mismo modo, se remarca la importancia de la investigación e innovación en el desarrollo de nuevos antimicrobianos (EFSA y ECDC, 2024). Por otra parte, la OMS desarrolla la herramienta “*AWaRe*” para clasificar los antibióticos en tres grupos en función de la restricción que deba haber para cada uno de ellos, reservando así los antibióticos de último recurso para cuando sean estrictamente necesarios (PRAN, 2024).

En el marco nacional, se desarrolla en 2014 el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN) como respuesta a la solicitud de la CE para tratar la problemática. Este plan de acción busca reducir el riesgo y la diseminación de las resistencias a antibióticos para reducir el impacto en la salud humana mundial (PRAN, 2023). Para ello, aplica medidas como vigilar el consumo de antibióticos, controlar las resistencias bacterianas, y formar a profesionales sanitarios en el uso de antibióticos.

2.5. Objetivos de Desarrollo Sostenible

En 2015 las Naciones Unidas adoptaron 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) como proyecto

mundial común para poner fin a la pobreza, proteger el planeta, y garantizar la paz de cara al año 2030 (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, 2024).

El presente trabajo se fundamenta en varios Objetivos de Desarrollo Sostenible, al ser la salubridad de los alimentos una aspiración de vital importancia, y al suponer la presencia de AMR un riesgo para la salud pública mundial. Por ello, el proyecto se centra en los ODS2: hambre cero y ODS 3: salud y bienestar, por buscar una producción más sostenible y segura. Se respalda también en los ODS 12: producción y consumo responsables y ODS 13: acción contra el clima, al estudiar una forma de cultivo más respetuosa con el medioambiente, que busca disminuir la huella de carbono, y una gestión de los recursos más eficiente.

3. ANTIBIÓTICOS Y SU PROBLEMÁTICA: APARICIÓN DE RESISTENCIAS

La introducción de los antibióticos en la clínica durante el siglo XX ha sido uno de los avances médicos más importantes hasta la fecha (Alós, 2015). Se considera el pasado siglo como la época dorada de los antimicrobianos, pues se descubrieron más de 20 clases de antibióticos, y algunos de ellos se siguen usando en la actualidad (Uddin *et al.*, 2021). El surgimiento de los antimicrobianos ha contribuido a reducir la mortalidad por enfermedades infecciosas, que era la principal causa de muerte a principios del siglo XX, además de aumentar la esperanza de vida de la población. Asimismo, han contribuido al avance de la ciencia y medicina al mejorar las condiciones sanitarias de algunas intervenciones médicas (Alós, 2015; Tang *et al.*, 2023). No obstante, su eficacia depende de diversos factores, donde la estructura y composición tanto del fármaco como de la bacteria tienen un papel crucial.

3.1. Tipos de antibióticos

Para que los antimicrobianos sean efectivos contra las bacterias, deberán atravesar en primer lugar la cubierta bacteriana, que varía en función del tipo de bacteria que se trate. Las bacterias Gram negativas poseen una membrana celular externa, lo que hace que ofrezcan una mayor resistencia que las bacterias Gram positivas al paso de sustancias. Una vez en el interior, los antibióticos deben evitar ser hidrolizados o transformados en otros productos, además de tener la misión de reconocer su diana específica. Los antimicrobianos pueden ejercer su acción sobre diferentes estructuras o alterando diferentes funciones a nivel molecular (Calvo y Martínez-Martínez, 2009):

[3.1.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana](#)

La gran diferencia entre la osmolaridad del citoplasma bacteriano y el medio en el que se encuentra la bacteria se mantiene gracias a la pared celular. Ante la destrucción de esta barrera, el gradiente de osmolaridad conllevaría a la muerte del microorganismo. En este mecanismo se basan los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana en alguna de sus tres fases, y para que sean efectivos, es necesario que la bacteria se encuentre en un medio isotónico o hipertónico (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). El hecho de que no haya peptidoglicanos en las células animales hace que estos antibióticos sean muy selectivos, y de este modo disminuye la toxicidad hacia células humanas (Uddin *et al.*, 2021).

La pared celular bacteriana está formada por peptidoglicanos entrelazados, compuestos por cadenas alternantes de dos azúcares, N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM). Al NAM se le une un péptido de cuatro o cinco aminoácidos en conformación D y L. Uno de estos aminoácidos es D-alanina, que se une a otros residuos iguales formando dipéptidos D-alanina – D-alanina, responsables del entrecruzamiento de cadenas (Uddin *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2023).

La fosfomicina (fosfonopéptido) y cicloserina (isoxazolidinona) actúan en la primera fase de la síntesis de peptidoglicano, bloqueando la síntesis de los precursores al inhibir alguna de las enzimas responsables. La bacitracina, por su parte, bloquea al transportador que traslada los precursores desde el citoplasma hasta la membrana plasmática (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Son numerosos los antibióticos que actúan sobre la etapa de organización estructural del peptidoglicano, pudiendo dividirse en dos grandes grupos: glucopéptidos y β -lactámicos. Los glucopéptidos, como la vancomicina y la teicoplanina, se unen a los terminales aminoácidos del precursor del peptidoglicano e impiden así la unión de enzimas glucosiltransferasas y transpeptidasas. De esta forma se bloquea la síntesis del peptidoglicano, proporcionando una pared defectuosa que conlleva a la muerte bacteriana. El gran tamaño de este tipo de fármacos hace que no puedan atravesar la pared bacteriana de las Gram negativas, de modo que sólo son efectivas contra microorganismos Gram positivos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Kohanski *et al.*, 2010).

Por su parte, los antibióticos β -lactámicos inhiben las fases finales de la síntesis de los peptidoglicanos, donde los componentes se entrelazan mediante la acción de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) con actividad transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa. Los antibióticos de este grupo se caracterizan por tener un anillo lactámico cuadrado con un grupo carbonilo en posición β con respecto a un nitrógeno (Kim *et al.*, 2023). Esta estructura se asemeja al dipéptido D-alanina – D-alanina del extremo terminal del peptidoglicano, que supone el sustrato principal de las enzimas PBP, tal y como se muestra en la **Figura 1**. Cuando el antibiótico se une a las enzimas PBP, bloquea su actividad e impide la formación de un peptidoglicano estable que proporcione rigidez a la pared celular (Wanger *et al.*, 2017). Los antibióticos β -lactámicos son los más efectivos y por tanto los más usados. Se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Kim *et al.*, 2023).

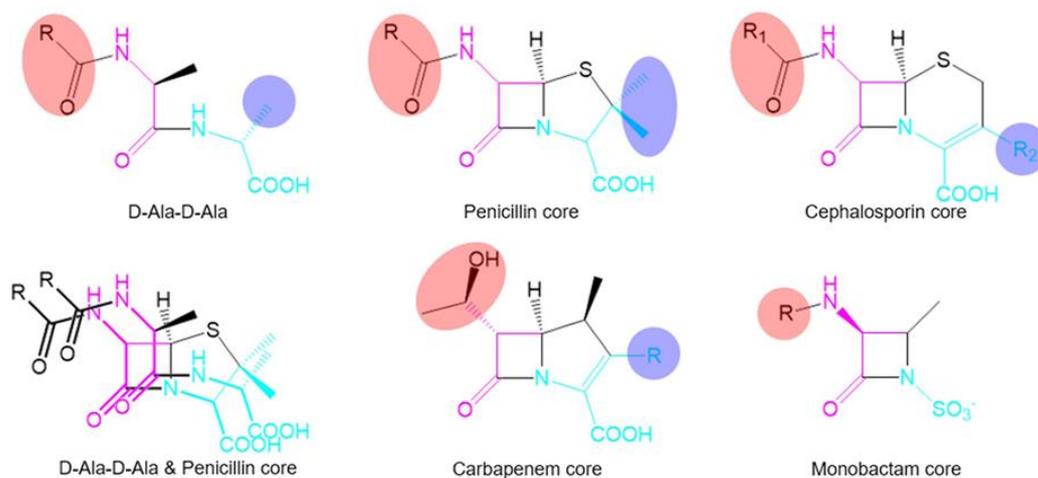


Figura 1. Estructura del dipéptido D-Alanina-D-Alanina que conforma el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, y su similitud con la estructura de los cuatro grupos que conforman los antibióticos β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Adaptado de "Structural Insights for β -Lactam Antibiotics" por Kim, D. *et al.* (2023). *Biomolecules & Therapeutics*, 31(2), 141-147.

El avance de las cefalosporinas ha estado marcado por la aparición de resistencias a las mismas, lo que ha propiciado el desarrollo constante de nuevos fármacos clasificados en generaciones. Las cefalosporinas de tercera y cuarta generación se caracterizan por su amplio espectro de actividad y su mayor eficacia contra bacterias Gram negativas. Sin embargo, el surgimiento de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) compromete su efectividad (Wanger *et al.*, 2017). Los antibióticos carbapenémicos son fármacos de amplio espectro que se emplean para diversos tipos de infecciones por su capacidad para resistir la acción de β -lactamasas. Sin embargo, sí son sensibles a la acción de enzimas carbapenemasas presentes en algunas bacterias Gram negativas (Bush y Bradford, 2016).

[3.1.2. Antibióticos activos en la membrana plasmática](#)

Los fármacos que actúan sobre la membrana plasmática alteran su permeabilidad para provocar la salida o entrada de diferentes iones que alteren la concentración óptima del medio citoplasmático, o la pérdida de metabolitos esenciales para la supervivencia celular. Es el caso de las polimixinas, lipopéptidos, los antibióticos poliénicos, los ionóforos y los formadores de poros. Estos fármacos pueden producir daños también a las células humanas (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

[3.1.3. Antibióticos inhibidores de la síntesis proteica](#)

La diferencia estructural entre los ribosomas bacterianos y los eucariotas permite inhibir la síntesis proteica bacteriana sin afectar al proceso homólogo en las células humanas. Los ribosomas bacterianos contienen dos subunidades de ARN ribosómico y proteínas, que constituyen dianas de numerosos antibióticos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009):

Los antibióticos inhibidores de la fase de activación bloquean las enzimas aminoacil-ARNt sintetasa, que unen el aminoácido pertinente y lo trasladan al péptido en formación. Por ejemplo, la mupirocina inhibe la isoleucil-ARNt-sintetasa y bloquea así la unión de la isoleucina a la proteína que se está sintetizando, dando lugar a estructuras disfuncionales (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Los antibióticos inhibidores del inicio de la síntesis proteica actúan sobre la unión del ARNt de formilmetionina al codón del ARNm donde se fija para comenzar la síntesis de la proteína. Aquellos de la familia de las oxazolidinonas (como el linezolid) se unen a la subunidad grande ribosomal e impiden la unión del formilmetionil-ARNt al mismo, evitando así la formación del complejo de iniciación de la síntesis proteica (Uddin *et al.*, 2021).

Los aminoglucósidos, por su parte, se unen a la subunidad pequeña del ribosoma provocando errores de lectura que proporcionan proteínas defectuosas (Kohanski *et al.*, 2010; Bassetti *et al.*, 2013). Los inhibidores de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma impiden la incorporación de aminoácidos a la cadena en formación. Así funcionan las tetraciclinas y glicilciclinas, que se unen a la subunidad pequeña ribosomal y bloquean la unión del complejo aminoacil-ARNt al mismo (Kohanski *et al.*, 2010). Los antibióticos inhibidores de la elongación bloquean la transpeptidación, evitando la acción de la peptidiltransferasa. Los macrólidos, lincosamidas, estreptograminas del grupo B, cetólidos y aminoglucósidos actúan en esta fase uniéndose al ARNr o alguna de las proteínas asociadas de la subunidad 50S ribosomal (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

3.1.4. Antibióticos que actúan sobre en el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos

Algunos antibióticos actúan sobre el ADN bacteriano, buscando inhibir la transcripción y replicación, como es el caso de las rifamicinas y las quinolonas, o dañando directamente las hebras, como los nitroimidazoles y nitrofuranos. La similitud entre estos procesos en la célula procariota y eucariota hace que estos fármacos no sean totalmente selectivos y puedan causar toxicidad en las células humanas (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Las rifamicinas bloquean la síntesis de ARNr y ARNm mediante el bloqueo de la enzima ARN polimerasa, reprimiendo el comienzo de la transcripción. Las quinolonas, por su parte, bloquean las topoisomerasas I y IV e impiden así que el ADN sea desenrollado para su lectura (Kohanski *et al.*, 2010). Los nitroimidazoles y nitrofuranos son reducidos en el citoplasma bacteriano y forman derivados tóxicos que dañan el ADN bacteriano (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

3.1.5. Antimicrobianos que bloquean mecanismos de resistencia

Existen antibióticos que inhiben la actividad de las enzimas β -lactamasas, como son el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Se unen irreversiblemente a las β -lactamasas e impiden así que estas realicen su función (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). El ácido clavulánico se combina generalmente con amoxicilina para tratar infecciones por bacterias productoras de β -lactamasas, el sulbactam combina con ampicilina, mientras que el tazobactam combina con piperaciclina. Además, la aparición de ESBL y carbapenemasas ha impulsado el desarrollo de nuevos inhibidores, como son avibactam, relebactam y vaborbactam. Este tipo de fármacos ha mejorado la capacidad de tratamiento de las infecciones causadas por bacterias resistentes (Bush y Bradford, 2016).

3.2. Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos se define como la incapacidad por parte de un antibiótico de inhibir el crecimiento bacteriano, lo que supone un fracaso del fármaco y favorece la propagación del microorganismo patógeno (EFSA y ECDC, 2024). La resistencia bacteriana a antibióticos puede ser natural o adquirida, y resulta inevitable debido a capacidad de adaptación de las bacterias para sobrevivir y replicarse evitando cualquier posible adversidad. La resistencia natural puede ser innata, siempre expresada en el microorganismo, o causada de forma normal por los mecanismos de cambio y evolución que poseen las bacterias, como son los cambios genéticos por mutación o por la activación de cascadas genéticas que induzcan mecanismos de resistencia. Las mutaciones genéticas se dan de forma aleatoria durante la replicación, donde se pueden modificar algunos pares de bases y alterar así la secuencia aminoacídica de las proteínas resultantes. Esto puede afectar a la acción de algunas enzimas o de orgánulos estructurales, propiciando la inefectividad de algunos antibióticos (Uddin *et al.*, 2021). Las AMRs también pueden ser adquiridas de otras especies resistentes mediante la transferencia horizontal de material genético por conjugación, transformación y transducción (Alós, 2015).

La presión selectiva que ejerce el uso de antibióticos puede impulsar el desarrollo de resistencias, ya que su uso puede derivar o bien en la muerte bacteriana o bien en la adquisición de AMR al tratamiento al haber desencadenado y activado alguno de los mecanismos de resistencia (Uddin *et al.*, 2021). Estos

pueden ser mecanismos de variación genética como mutación, recombinación o transposición, o la activación de cascadas que promuevan el intercambio de genes entre bacterias. Por consiguiente, la presión selectiva por el uso masivo de antibióticos durante los últimos años ha contribuido a la dispersión de ARGs (Alós, 2015).

3.2.1. Factores que favorecen la aparición de resistencias

Algunos factores han propiciado que la aparición de las ARM haya sido rápida y global. El desarrollo de nuevas terapias antibióticas de forma acelerada y relativamente fácil durante el último siglo ha conducido a un uso excesivo de los mismos, en ocasiones de forma inadecuada (Uddin *et al.*, 2021).

El mal uso se debe en cierta medida a la prescripción inadecuada por parte de sanitarios, que en ocasiones recetan antibióticos ante infecciones sin la certeza de que sean de origen bacteriano. Además, se prescriben antibióticos de amplio espectro en gran medida en lugar de aquellos que son del espectro concreto necesario (Uddin *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2023). Por otro lado, el mal uso y/o abuso de los antibióticos por parte de los pacientes también resulta problemático. Algunos de ellos se automedican sin haber sido evaluados por un profesional sanitario, y otros, en cambio, no completan la pauta indicada y pueden favorecer la supervivencia de superbacterias resistentes (De Sousa Oliveira *et al.*, 2016; Uddin *et al.*, 2021).

El uso extensivo de antibióticos en ganadería para engordar al ganado provocó que este fuera un reservorio de bacterias resistentes con capacidad de propagarse al consumidor a través de la cadena alimentaria (Uddin *et al.*, 2021). Debido a esto, y que aproximadamente el 70 % de los antibióticos usados en salud humana son empleados también en ganadería, esta práctica se prohibió hace años mediante el Reglamento (CE) nº. 1831/2003 (2003). La UE y la OMS decidieron reducir y restringir los fármacos que se pueden emplear en animales (Tang *et al.*, 2023). Por otra parte, los desechos animales pueden contener también bacterias patógenas que, en caso de emplear el estiércol como fertilizante, podrían contaminar cultivos y vegetales (Uddin *et al.*, 2021). De hecho, se ha encontrado que los vegetales ecológicos fertilizados con estiércol poseen mayores residuos de antibióticos, lo que puede favorecer la selección y proliferación de ARB en estos vegetales, que podrían actuar como reservorios de las mismas (Xu *et al.*, 2016). Por ello, algunos autores sugieren que los alimentos frescos pueden favorecer la propagación de ARB. En China se identificó lechuga fresca contaminada con una cepa de *E. coli* productora de carbapenemasas de las familias NDM y KPC, en Irán se encontraron bacterias productoras de carbapenemasas en distintas verduras, y en Argelia se encontró *Klebsiella pneumoniae* productora de la β -lactamasa OXA-48 en productos frescos (Taggar *et al.*, 2020).

Por otra parte, el vertido de aguas con restos de antibióticos al medioambiente supone también un riesgo para la diseminación y selección de bacterias resistentes. Por ello se considera que las depuradoras son también reservorios de posibles ARB patógenas (Alós, 2015).

3.2.2. Mecanismos de resistencia

Existen cuatro mecanismos que pueden provocar que un antibiótico deje de ser efectivo contra bacterias: limitación de la integración del fármaco, modificaciones en la diana del antibiótico, inactivación del fármaco o excreción del mismo. Conociendo las diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, cada grupo emplea diferentes métodos: mientras que aquellas Gram negativas pueden emplear cualquiera de los cuatro mecanismos, la estructura de la pared de las Gram positivas limita su capacidad de intervenir en la entrada y salida de fármacos (Uddin *et al.*, 2021).

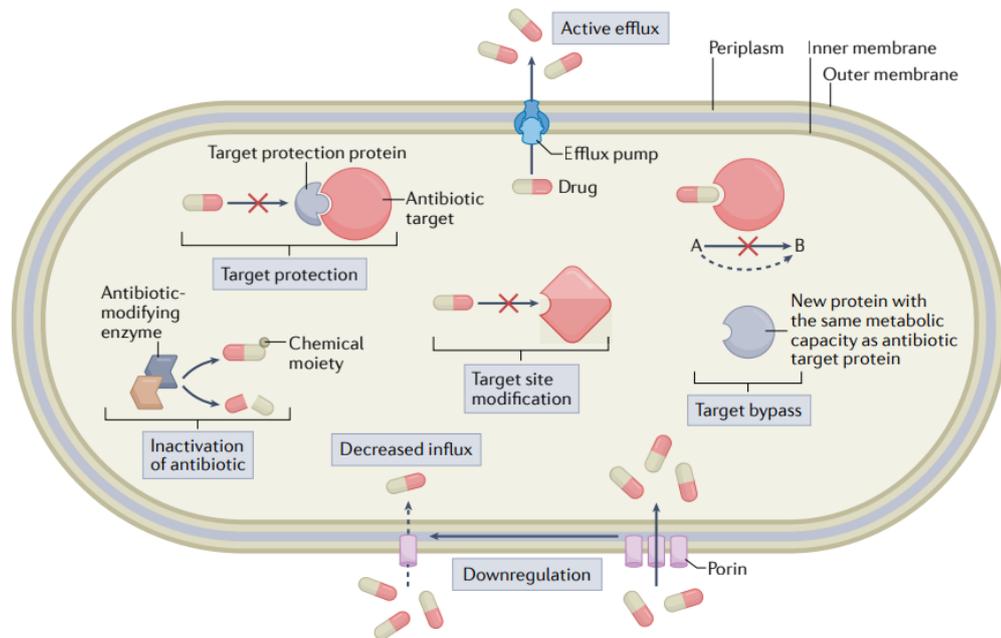


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos moleculares que poseen las bacterias para ser resistentes a diferentes antibióticos. Adaptado de “*Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited*”, por Darby E. *et al.*, (2022). *Nature Reviews. Microbiology*, 21(5), 280-295.

La pared celular de las bacterias Gram negativas es menos permeable y, por tanto, algunos fármacos tienen mayores dificultades para penetrar. Asimismo, la efectividad de antibióticos como los β -lactámicos, tetraciclinas y fluoroquinolonas se ve afectada en gran medida por las alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática. Algunos estudios sugieren que una menor expresión de porinas por parte de las bacterias favorece la resistencia a carbapenémicos en *Enterobacteriales*, *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas spp.* (De Sousa Oliveira *et al.*, 2016).

Hay bacterias que emplean bombas de flujo para expulsar los antibióticos, impidiendo que lleven a cabo su acción en el interior celular (**Figura 2**) (Darby *et al.*, 2022). Los sistemas de expulsión son de gran complejidad y fundamentales para conferir resistencia (De Sousa Oliveira *et al.*, 2016). Es el caso de la resistencia a tetraciclinas y macrólidos, donde el intercambio de protones actúa como fuente de energía para expulsar el fármaco (Uddin *et al.*, 2021).

Los antibióticos pueden ser inactivados mediante su destrucción o modificación (**Figura 2**). Algunas enzimas bacterianas pueden atacar la estructura del fármaco mediante su acetilación, fosforilación o adenilación, modificándolo e inactivándolo. Otras bacterias cuentan con enzimas β -lactamasas que atacan el grupo carbonilo del anillo β -lactam de los antibióticos β -lactámicos y lo destruyen,

proporcionando resistencia (Uddin *et al.*, 2021). Los genes que codifican para enzimas β -lactamasas suelen estar en elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones, lo que facilita la transferencia horizontal de genes a otras bacterias próximas (Kim *et al.*, 2023).

La alteración de la diana del antibiótico es un mecanismo adicional empleado por las bacterias (**Figura 2**). Algunas de ellas modifican la estructura de las PBP y hacen así que los antibióticos β -lactámicos dejen de ser efectivos (Wanger *et al.*, 2017). En función de qué PBP sea alterada, la bacteria obtendrá resistencia a unos u otros antibióticos β -lactámicos (De Sousa Oliveira *et al.*, 2016). Otras bacterias alteran la estructura de las topoisomerasas para impedir la acción de los fármacos que bloquean estas enzimas (Uddin *et al.*, 2021).

3.2.3. β -lactamasas y ARGs

Las β -lactamasas pueden ser penicilinasas, cefalosporinasas AmpC (ambas capaces de eludir la acción de inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico), carbapenemasas o ESBL (De Sousa Oliveira *et al.*, 2016).

Las enzimas ESBL, como por ejemplo aquellas de la familia TEM, SHV o CTX, pueden hidrolizar tanto penicilinas como cefalosporinas, y por tanto confieren resistencia a estos grupos de antibióticos. De hecho, las enzimas TEM y SHV pueden proporcionar resistencia también hacia tetraciclinas, sulfonamidas y aminoglucósidos (De Sousa Oliveira *et al.*, 2016). No obstante, no muestran efectividad contra antibióticos carbapenémicos, que se han convertido en una herramienta fundamental contra bacterias productoras de ESBL. Además, son inhibidas por ácido clavulánico. Estas enzimas se encuentran comúnmente en *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, generalmente codificadas por genes presentes en plásmidos (Wanger *et al.*, 2017).

Por otro lado, las enzimas carbapenemasas confieren resistencia a antibióticos carbapenémicos (De Sousa Oliveira *et al.*, 2016). Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Se subdividen en cuatro clases en función de su estructura y mecanismo, denominadas como A, B, C y D (Halat *et al.*, 2016). En la clase A destaca KPC, con capacidad para hidrolizar todos los antibióticos β -lactámicos, y que además no se inhibe por ácido clavulánico. Existen casi cien variantes de enzimas KPC (Lepe y Martínez-Martínez, 2022). En la clase B se encuentran IMP y VIM, en la clase C está CMY-2, y en la clase D se localizan las proteínas de la familia OXA como OXA-48 entre otras (Halat *et al.*, 2016). VIM tiene una alta prevalencia en *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacteriaceae, mientras que KPC y OXA-48 se encuentran principalmente en *Klebsiella pneumoniae*. Los genes *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* se asocian a integrones, los de *bla_{KPC}* se encuentran en plásmidos y los de *bla_{OXA-48}*, en plásmidos y transposones. Aunque la actividad de OXA-48 contra carbapenémicos no es muy elevada, supone un gran riesgo por su gran diseminación global (Halat *et al.*, 2016).

Para la detección molecular de ARG se pueden emplear diferentes técnicas basadas en la PCR, como PCR múltiple o PCR cuantitativa, incluso recurriendo a la secuenciación de los amplicones para conocer la secuencia de los genes. También pueden emplearse técnicas de hibridación del ADN para la detección simultánea de varios genes (Halat *et al.*, 2016).

3.2.4. [Perspectiva de futuro](#)

La rápida extensión de las AMRs ha provocado que apenas queden nuevas fórmulas de tratamiento efectivas por desarrollar. Hoy en día, gran parte de las farmacéuticas que se dedicaban al desarrollo de nuevos antibióticos en el siglo XX ha abandonado ya esta tarea. El desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica se ha ralentizado por los desafíos que supone a nivel de conocimiento y nivel técnico, además de las trabas existentes en cuanto a regulación. Por otra parte, a pesar de que se desarrollen nuevos fármacos, es inevitable la aparición de resistencias a estos (Uddin *et al.*, 2021). Por este motivo es fundamental el desarrollo de posibles nuevas terapias que ayuden a combatir bacterias resistentes. Una de las principales alternativas a los antibióticos que se está investigando son los bacteriófagos, virus capaces de eliminar bacterias que, además de ser muy efectivos, no producen algunos efectos secundarios propios de los antibióticos (Alós, 2015; Uddin *et al.*, 2021).

Por otro lado, aunque la aparición de resistencias es inevitable, se puede trabajar en retrasar su surgimiento, para lo cual es crucial promover el uso racional de fármacos tanto a la población en general como a los sanitarios en particular, y limitar su abuso en ganadería (Alós, 2015). Es fundamental también llevar una vigilancia exhaustiva del avance y desarrollo de las resistencias, estudiando y prestando especial atención a los patógenos prioritarios (Uddin *et al.*, 2021).

II. OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es evaluar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en verduras ecológicas procedentes de la huerta valenciana. Asimismo, se pretende determinar la resistencia a ciertos antibióticos carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación de las cepas aisladas, y comprobar la presencia de alguno de los genes que contribuyen a ello. Por tanto, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar, e identificar mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), bacterias de tipo Gram negativas resistentes a carbapenémicos presentes en vegetales frescos de cultivo ecológico y convencional procedentes de la huerta valenciana.
2. Estudiar la sensibilidad de las cepas aisladas a antibióticos de dos familias: imipenem y meropenem de la familia de los antibióticos carbapenémicos, y cefotaxima y ceftazidima como cefalosporinas de tercera generación.
3. Determinar qué genes de resistencia de β -lactamasas de espectro extendido (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2}) o carbapenemasas (*bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}) presenta cada una de las cepas aisladas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ORIGEN DE MUESTRAS VEGETALES

El material vegetal de estudio fue adquirido entre noviembre de 2023 y febrero de 2024 de 11 puntos de venta de la ciudad de Valencia, incluyendo supermercados, pequeños distribuidores y mercadillos. Se analizaron un total de 40 muestras, y 5 tipos de vegetales distintos: lechuga (*Lactuca sativa*, $n=8$), kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*, $n=8$), espinaca (*Spinacia oleracea*, $n=8$), rúcula (*Eruca vesicaria*, $n=8$), y chufa (*Cyperus esculentus*, $n=8$) (**Tabla 1**). Del total de muestras, un 30 % ($n=12$) provenía de cultivo convencional, mientras que el 70 % restante ($n=28$) procedía de cultivo ecológico y, por tanto, fueron obtenidas de comercios con el certificado pertinente que lo acredite. Para cada verdura se analizaron 6 muestras de cultivo ecológico y 2 de convencional, excepto para la chufa, pues al ser el producto con menos bibliografía de referencia, se examinaron 4 muestras de cada tipo.

Tabla 1. Muestras analizadas, incluyendo el tipo de vegetal, tipo de cultivo, y su respectivo código.

VEGETAL	TIPO DE CULTIVO	CÓDIGO
Lechuga	Ecológico	P3, P6, P13, P23, P24, P29
	Convencional	P16, P32
Kale	Ecológico	P2, P8, P18, P20, P22, P26
	Convencional	P36, P41
Espinaca	Ecológico	P4, P12, P14, P19, P25, P28
	Convencional	P17, P30
Rúcula	Ecológico	P7, P9, P27, P31, P33, P38
	Convencional	P39, P40
Chufa	Ecológico	P10, P15, P21, P34
	Convencional	P5, P11, P35, P37

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES

2.1. Aislamiento y obtención del cultivo puro

Tras la recolección del material y una vez en el laboratorio, se cortaron y pesaron 10 gramos de las hojas externas en condiciones de asepsia y se introdujeron en bolsas estériles de 400 ml para Stomacher de BagPage® (Interscience BagSystem, Saint Nom la Bretèche, Francia). Para favorecer la selección de bacterias Gram negativas, y más concretamente aquellas de la familia Enterobacteriaceae, a cada bolsa se le adicionaron 90 ml de Agua de Peptona Tamponada (APT) (Scharlau, Barcelona, España) suplementada con dos antibióticos: vancomicina (8 mg/L), para eliminar las bacterias Gram positivas presentes, y meropenem (1 mg/L), para aislar bacterias con resistencia a antibióticos carbapenémicos. Se quería aislar selectivamente enterobacterias resistentes a carbapenémicos por haber sido determinadas por la OMS como bacterias críticas prioritarias para ser investigadas por su impacto en la salud humana (OMS, 2024e). No obstante, cualquier bacteria Gram negativa aislada y, por tanto, potencialmente resistente será estudiada. La muestra se homogenizó masajeando suavemente la bolsa, y fue incubada durante 24 horas a 37°C en aerobiosis.

Seguidamente, y con el fin de seleccionar aquellas colonias resistentes, se adicionan 100 µl del caldo homogeneizado en una placa de cultivo Cromogéno SuperCarba (SC, CHROMagar™ mSuperCarba™, París, Francia), distribuyéndolo en superficie con ayuda de un asa de Digralski. Este medio contenía cromóforos que ayudan a la identificación de las cepas bacterianas en función del color que muestren, además de una combinación de antibióticos carbapenémicos para seleccionar cepas resistentes a los mismos. La placa se incubó a 37°C durante 24 horas. Por otro lado, se agregaron 15 ml del caldo homogeneizado a un tubo Falcon que fue almacenado a -80°C para futuros estudios.

Transcurrido el tiempo de incubación, se apreciaron en la placa de cultivo SC las diferentes colonias crecidas sospechosas de ser resistentes, diferenciadas por su color y morfología. Cada tipo de colonia, hasta un máximo de cinco, fue picada con un asa de siembra, y se sembró mediante triple estría en una placa de cultivo de Agar Plate Count (PCA) (Scharlau, Barcelona, España). Se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas para obtener cultivos puros de aquellas cepas sospechosas de ser resistentes a antibióticos.

2.2. Estudio de la sensibilidad a antibióticos de las cepas aisladas

Se busca conocer el perfil de resistencia de las colonias puras aisladas previamente, y seleccionar aquellas que sean resistentes a carbapenémicos y/o cefalosporinas de tercera generación. Para ello, las cepas se sometieron a una prueba de sensibilidad o antibiograma mediante la técnica de disco de difusión, según indica la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología (SEIMC, 2000), colocando discos comerciales de 6 mm de diámetro impregnados de antibiótico para medir el diámetro del halo que impide el crecimiento bacteriano alrededor del disco. Con esta finalidad se seleccionaron discos embebidos con 4 antibióticos, pertenecientes a 2 familias distintas: imipenem (IMP, 10 µg) y meropenem (MEM, 10 µg) de la familia de los carbapenémicos, y, cefotaxima (CTX, 30 µg) y ceftazidima (CAZ, 30 µg) como C3G (Fisher scientific, Madrid, España).

Además, se emplearon también discos que combinaban C3G con ácido clavulánico: cefotaxima + ácido clavulánico (CTL, 40 µg), y ceftazidima + ácido clavulánico (CAL, 40 µg), ya que dicho compuesto actúa como inhibidor de β-lactamasas. De este modo se comprueba la dependencia que tienen las bacterias de enzimas ESBL para desarrollar resistencia a β-lactámicos: si precisan de ellas para tolerar C3G y ser resistentes a ellas, se observa que los discos con ácido clavulánico tienen a su alrededor un halo con un diámetro al menos 5 mm mayor que el presente en los discos de cefotaxima y ceftazidima (EUCAST, 2017).

Para llevar a cabo la prueba de sensibilidad, se recogieron mediante asa de siembra las colonias puras iguales entre sí que aparecían aisladas en el cultivo en PCA crecido 24 horas a 37°C. Fueron diluidas posteriormente en un eppendorf de 1,5 ml con 500 µl de PBS 1x estéril, hasta observar una turbidez correspondiente a 0,5 en la escala de Mc Farland. A continuación, para realizar el antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer *et al.* (1966), se sembraron 100 µl de la preparación bacteriana en cada placa de cultivo Müller-Hinton (MH) y se repartieron en masa mediante un hisopo estéril, distribuyendo en todas las direcciones hasta que el medio absorbiera todo el líquido. Transcurridos dos minutos, se colocaron los discos de antibiótico con ayuda del dispensador (OXOID Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Dispenser), de modo que IMP y MEM quedaron en una placa dispuestos en

polos opuestos, y CTX, CAZ, CTL y CAL se colocaron en otra placa diferente dispuestos lo más separados posible para evitar la superposición de los halos. Todo el proceso tuvo lugar en condiciones de asepsia en campana de flujo, y el dispensador fue desinfectado con etanol entre diferentes siembras. Las placas de MH permanecieron en incubación durante 24 horas a 37°C, y transcurrido ese tiempo, se pudieron medir los halos resultantes. En función del tamaño del halo en milímetros, se puede determinar si la cepa es sensible o resistente al antibiótico dispensado, comparando la medida obtenida con los puntos de corte establecidos por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) en 2024 para Enterobacterales (EUCAST, 2024) (**Tabla 2**). Para aquellas bacterias que, una vez identificadas, pertenezcan al grupo de no fermentadores, se compara la medida del halo con los valores de *Pseudomonas* spp. (EUCAST, 2024) y *Acinetobacter* spp. (CLSI, 2023), tal y como se realiza en el trabajo de Yagel *et al.* (2020) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Antibióticos empleados para el estudio de resistencias a antimicrobianos de los aislados, clasificados por grupos. Los valores se clasifican en resistentes o sensibles según el diámetro del halo de inhibición en milímetros, aplicable para diferentes géneros bacterianos.

Grupo	Antibiótico y carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm) en función de la especie					
		Enterobacterales ¹		<i>Pseudomonas</i> spp. ¹		<i>Acinetobacter</i> spp. ²	
		S	R	S	R	S	R
Carbapenémicos	Imipenem (IMP) (10µg)	≥22	<19	≥50	<20	≥22	<18
	Meropenem (MEM) (10µg)	≥22	<16	≥24	<18	≥18	<14
Cefalosporinas	Cefotaxima (CTX) (30µg)	≥20	<17	≥20	<17	≥23	<14
	Ceftazidima (CAZ) (30µg)	≥22	<19	≥50	<17	≥18	<14
Cefalosporinas + ácido clavulánico	Cefotaxima + ácido clavulánico (CTL) (40µg)	≥25	<22	≥25	<33	≥28	<19
	Ceftazidima + ácido clavulánico (CAL) (40µg)	≥27	<24	≥55	<22	≥23	<19

¹: valores reflejados en EUCAST, 2024; ²: valores reflejados en CLSI, 2023

Una vez medido el halo con una regla milimetrada (mm), aquellas cepas crecidas en MH que poseían resistencia al menos a un antibiótico se pasaron a un tubo de crioconservación con esferas de plástico y medio de glicerina (VWR Preservation System Cryoinstant, Barcelona, España) para su conservación a -80°C de forma indefinida. Por otro lado, las mismas cepas se resuspendieron en un eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de PBS 1x estéril para la posterior extracción de ADN.

2.3. Identificación de las bacterias resistentes

La identificación de las bacterias aisladas potencialmente resistentes se realizó mediante espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF, que caracteriza el perfil proteico bacteriano y lo compara con la base de datos, identificando así la especie presente.

Las cepas conservadas a -80°C fueron descongeladas y sembradas en placas de PCA repartiendo las esferas de plástico con un asa de siembra. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas hasta observar crecimiento bacteriano, momento en el que se retiraron las esferas de plástico con pinzas

estériles en condiciones de asepsia. Las placas cultivadas fueron trasladadas al servicio de Microbiología del Hospital General de Valencia, que identificó las cepas aisladas.

3. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

3.1. Extracción y cuantificación del ADN de las cepas aisladas

La extracción de ADN partía de cultivos puros resuspendidos en 500 µl de PBS 1x estéril, que fueron centrifugados a 5.000 rcf durante 10 minutos. Posteriormente, el ADN fue extraído empleando el kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) siguiendo el protocolo de purificación de ADN genómico para bacterias Gram negativas.

Una vez el ADN fue eluído, se midió su concentración y pureza mediante el espectrómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), comprobando que el ratio 260/280 fuera cercano a 1,8; y el ratio 260/230 fuera similar a 2 para confirmar que el ADN era de calidad.

3.2. PCR múltiplex de genes de resistencia a β-lactámicos

Se buscaba detectar genes de resistencia mediante reacciones de PCR múltiplex (mPCR) en el ADN extraído de las cepas resistentes, para lo que se estudiaron un total de siete genes: tres de ellos codifican para ESBL (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY-2}*), y los cuatro restantes se expresan como carbapenemasas (*bla_{VIM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*). Se realizaron tres mPCR: (1) para la detección de *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY-2}*, (2) para la detección de *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}*, y (3) para la detección de *bla_{OXA-48}* y *bla_{IMP}*. Estos genes fueron seleccionados por su alta prevalencia en bacterias Gram negativas patógenas ambientales productoras de ESBL y carbapenemasas (Taggar *et al.*, 2020). Los *primers* necesarios para cada gen, así como las condiciones de PCR y el tamaño de cada amplicón se refleja en la **Tabla 3**.

Las condiciones de la mezcla para la PCR (1) fueron: tampón de PCR 1x; MgCl₂ a 2,5 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada *primer* de *bla_{TEM}*; 0,2 µM de cada *primer* de *bla_{CMY-2}*; 0,4 µM de cada *primer* de *bla_{SHV}*; 5 U de DNA Taq polimerasa NZYtaq II (NZYtech, Lisboa, Portugal); y agua MiliQ hasta alcanzar un volumen total de 23 µl de mix, al que se le añadieron 2 µl de ADN en cada muestra estudiada. Las condiciones del termociclador para esta mPCR fueron descritas por Kozak *et al.* (2009): 15 minutos a 94°C, 30 ciclos de amplificación que incluyen 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, y 1 minuto a 72°C, y una fase final de elongación de 10 minutos a 72°C (**Tabla 3**).

En cada reacción, además de las muestras a estudiar, se incluyeron los siguientes controles: la cepa perteneciente a la colección del laboratorio 6021bv2 como control positivo para *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*, la cepa *Escherichia coli* MEC8 como control positivo para el gen *bla_{CMY-2}*, y agua MiliQ como control negativo.

El mix para la PCR (2) y (3) contenía tampón para PCR 1x; MgCl₂ a 1,5 mM; 0,125 µM de dNTPs; 0,4 µM de cada *primer* de *bla_{KPC}* y 0,4 µM de cada *primer* de *bla_{VIM}* en el caso de la PCR (2); y 0,4 µM de cada *primer* de *bla_{OXA-48}* y 0,4 µM de cada *primer* de *bla_{IMP}* en el caso de la PCR (3); 2 U de DNA Taq polimerasa NZYtaq II (NZYtech, Lisboa, Portugal); agua MiliQ hasta enrasar el volumen final de 22,5 µl; y 2,5 µl de ADN para cada muestra estudiada. Las condiciones del termociclador fueron descritas por Poirel *et al.* (2011): 10 minutos a 72°C, 36 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 55°C y 50 segundos a 72°C, que finalizan con 5 minutos de elongación a 72°C (**Tabla 3**).

En la mPCR (2) se empleó la cepa *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440 como control positivo de *bla_{VIM}*, la cepa *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13438 como control positivo de *bla_{KPC}*, y agua MiliQ como control negativo. Para la mPCR (3) se empleó la cepa *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13442 como control positivo de *bla_{OXA-48}*, la cepa *Escherichia coli* NCTC 13476 como control positivo de *bla_{IMP}*, y agua MiliQ como control negativo.

Tabla 3. Genes de resistencia estudiados mediante PCR, el tamaño de amplicón esperado, la secuencia de los *primers* empleados y las condiciones de PCR requeridas. *F* = primer directo, *R* = primer reverso.

Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia de los <i>primers</i>	Condiciones	Referencia
<i>bla_{TEM}</i>	247	F: 5' - TTAAGTGGCGAACTACTTAC - 3' R: 5' - GTCTATTCGTCATCCATA - 3'	94°C 15 min (1 ciclo);	Kozak <i>et al.</i> (2009)
<i>bla_{SHV}</i>	393	F: 5' - AGGATTGACTGCCTTTTTG - 3' R: 5' - ATTTGCTGATTCGCTCG - 3'	94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min (30 ciclos);	
<i>bla_{CMY-2}</i>	1.000	F: 5' - GACAGCCTCTTTCTCCACA - 3' R: 5' - TGGACACGAAGGCTACGTA - 3'	72°C 10 min	
<i>bla_{KPC}</i>	798	F: 5' - CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG - 3' R: 5' - CTTGTCATCCTTGTTAGGCG - 3'		
<i>bla_{VIM}</i>	390	F: 5' - GATGGTGTGGTGGTCGCATA - 3' R: 5' - CGAATGCGCAGCACCAG - 3'	94°C 10 min (1 ciclo); 94°C 30 s, 55 °C 40 s,	Poirel <i>et al.</i> (2011)
<i>bla_{IMP}</i>	232	F: 5' - GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC - 3' R: 5' - GGTTTAAAYAAAACAACCACC - 3'	72°C 50 s (36 ciclos); 72°C 5 min	
<i>bla_{OXA-48}</i>	438	F: 5' - GCGTGGTTAAGGATGAACAC - 3' R: 5' - CATCAAGTTCAACCCAACCG - 3'		

3.3. Electroforesis en gel de agarosa para la detección de genes de resistencia

Los resultados de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa preparado al 2%. Para ello se disolvió 1,5 g de polvo de agarosa D1 (Condalab, Madrid, España) en 75 ml de tampón Tris Borato EDTA (TBE) 1x (Tris base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM) en un matraz. Se llevó a ebullición, y tras su atemperado en agitación, se añadieron 5 µl de la tinción RedSafe (NZYtech Premium, Barcelona, España) en oscuridad para poder observar las bandas al revelarlo. La mezcla se vertió en el molde de electroforesis con un peine de 20 pocillos insertado en él, y se dejó atemperar en oscuridad.

Una vez solidificado el gel, se retiró el molde y se introdujo en una cubeta de electroforesis, cubriéndola con tampón TAE 1x. Se cargaron las muestras o controles correspondientes resultantes de la PCR, añadiendo 17 µl de producto de PCR homogeneizado con 3 µl de tampón de tinción de carga (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) en cada pocillo. En uno de los carriles se adicionaron 6 µl de marcador de pesos GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, Lituania).

Finalmente, se corrió el gel a 90 V durante 75 minutos en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se observó el gel a través de un transiluminador con luz UV (Vilber, Marne-la-Vallée, Francia) para apreciar las bandas resultantes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A β -LACTÁMICOS AISLADAS DE MUESTRAS VEGETALES

1.1. Aislamientos de bacterias potencialmente resistentes a carbapenémicos

De los 40 vegetales totales estudiados, se consiguió aislar entre 1 y 3 bacterias potencialmente resistentes en el 90 % de las muestras ($n=36$ muestras), hasta conseguir un total de 56 aislados potencialmente resistentes a carbapenémicos. Esto refleja la alta probabilidad de encontrar bacterias resistentes a antibióticos en los diferentes vegetales. Aquellas muestras de las que no se aislaron bacterias posiblemente resistentes fueron P18 (kale de cultivo ecológico), P22 (kale de cultivo ecológico), P30 (espinaca de cultivo convencional) y P36 (kale de cultivo convencional).

Del total de aislados, tal y como se muestra en la **Figura 3**, el 25 % procede de lechuga ($n=14$), el 23,2 % procede de rúcula ($n=13$), el 19,6 % viene de chufa ($n=11$), el 17,9% de espinaca ($n=10$), y el 14,3 % restante, de kale ($n=8$). Por tanto, se aisló un mayor número de cepas en lechuga y rúcula, mientras que el kale es el vegetal con un menor contenido en aislados, causado en parte por la ausencia de contenido microbiológico resistente en tres de los kales analizados (dos de ellos ecológicos, y uno convencional). Esto puede deberse a la superficie rugosa característica del kale, que dificulta la adhesión y proliferación bacteriana (Olaimat y Holley, 2012).

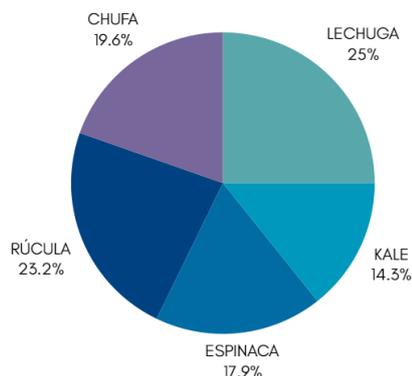


Figura 3. Porcentaje de aislados totales procedentes de cada tipo de vegetal. Fuente propia.

En el caso de todos los vegetales de hoja, al haber usado un mayor número de muestras vegetales de cultivo ecológico que de cultivo convencional (24 frente a 8), se aislaron más bacterias procedentes de cultivo ecológico (77,78 %; $n=35$) que de cultivo convencional (22,22 %; $n=10$). Sin embargo, en el caso de la chufa, donde se empleó la misma cantidad de muestras de ambos tipos (4 muestras de cada uno), se obtuvieron más aislados procedentes de vegetales de cultivo convencional que de cultivo ecológico (55 % de cultivo ecológico, frente a 45 % de cultivo convencional), si bien la diferencia es mínima.

1.2. Identificación de las bacterias aisladas mediante EM MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF logró identificar 54 de los 56 aislados totales, cuyo resultado se muestra en el Anexo I. Las cepas no identificadas fueron P23.1, procedente de lechuga de cultivo ecológico, y P38.2, procedente de rúcula ecológica, ya que no crecieron en PCA tras haber permanecido congeladas a -80°C . Esto muestra la necesidad de, en futuros trabajos, identificar la cepa bacteriana

con el cultivo fresco, previo a ser congelada en criovial, o mediante la secuenciación del gen 16S del ARNr.

La bacteria aislada de forma mayoritaria fue *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), con el 35 % de los aislados totales, habiéndose identificado en el 52,78% de los vegetales con contenido microbiológico (19 de los 36 vegetales totales). El género *Pseudomonas* spp. fue identificado en el 40 % de los aislados, estando presente en 15 vegetales diferentes (41,67 % de los vegetales). No obstante, de las 22 cepas identificadas para este género, solo pudo determinar la especie de 5 de ellas, 4 correspondientes a *Pseudomonas monteillii*, y 1 correspondiente a *Pseudomonas putida*, lo cual no permite comparar con exactitud la frecuencia de cada especie. Se identificó también la presencia de *Cupriavidus gilardii* (*C. gilardii*) en el 9 % de las cepas aisladas, procedentes de 5 vegetales diferentes; y de dos especies del género *Acinetobacter*, que suponen un 8% de los aislados al haber sido identificadas en 4 vegetales diferentes (*Acinetobacter lactucae* en lechuga y rúcula ecológica, y *Acinetobacter pittii* en rúcula y espinaca ecológica). Estaba presente también, aunque de forma minoritaria, la especie *Ochrobacterium intermedium* (*O. intermedium*), identificada tan solo en una ocasión y procedente de una rúcula ecológica, lo que representa un 1,9 % de los aislados totales (**Figura 4**).

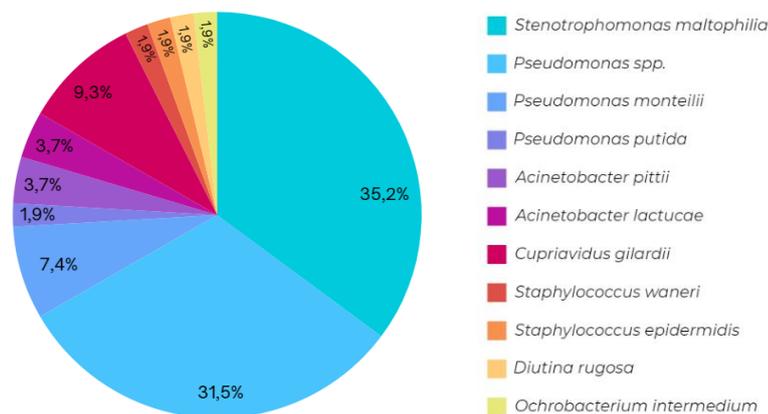


Figura 4. Distribución porcentual de cada especie bacteriana en el total de aislados identificados. Fuente propia.

Se identificaron también dos bacterias del género *Staphylococcus*, habiéndose encontrado en el 3,8 % de los aislados (*Staphylococcus warneri* procedente de espinaca de cultivo convencional, y *Staphylococcus epidermidis* de chufa de cultivo convencional). Es destacable porque las bacterias del género *Staphylococcus* son Gram positivas, y, por tanto, no deberían haber podido crecer en el caldo suplementado con vancomicina y haber sido aisladas posteriormente. Su presencia indica o bien que no son totalmente sensibles a la vancomicina en la concentración empleada, o que su presencia se debe a una contaminación en alguno de los puntos del procedimiento. Ambas cepas no serán tenidas en cuenta para el estudio de resistencias. El último de los aislados descritos corresponde a una levadura, *Diutina rugosa*, presente en lechuga de cultivo convencional, que no será tenido en cuenta en el estudio de resistencias antibióticas porque los antibióticos no son óptimos para su tratamiento y por tanto, estudiar su resistencia o sensibilidad es incongruente.

Es relevante que ninguna de las bacterias identificadas potencialmente resistentes a carbapenémicos pertenece a la familia Enterobacteriaceae, siendo este el uno de los objetivos del trabajo. Esto resulta

beneficioso para la salud de las personas que lo consumen, así como para la salud pública al evitar la propagación de resistencias microbianas. Sin embargo, este resultado dista de los obtenidos en trabajos similares, como el de Jiménez-Belenguer *et al.*, (2023), Ruimy *et al.* (2010) o Rico y Falomir (2020), donde sí se aislaron Enterobacterias de diversos vegetales, tal vez por haber usado una cantidad de muestras mucho mayor. No obstante, todos ellos aislaron bacterias medioambientales y no fermentadoras como *Stenotrophomonas* spp., *Acinetobacter* spp. o *Pseudomonas* spp., al igual que ocurre en este trabajo. De hecho, en el estudio de Jiménez-Belenguer *et al.* (2023), más de la mitad de aislados pertenecían a los géneros *Pseudomonas* spp. o *Stenotrophomonas* spp.

Si bien ninguna de las bacterias identificadas es reconocida como patógeno primario, algunas de ellas se definen como “patógenas oportunistas”, que, aunque serían inocuas *a priori*, pueden causar infecciones en personas inmunocomprometidas. Es el caso de *S. maltophilia*, a pesar de tener una baja virulencia, causa diversas infecciones nosocomiales en el ámbito hospitalario manifestadas como bacteriemias, infecciones respiratorias, infecciones oculares, endocarditis, o infecciones urinarias entre otras. Todas ellas son raras en personas inmunocompetentes, pero resultan más probables en aquellos individuos inmunocomprometidos (Brooke, 2021). Por tanto, la presencia y gran frecuencia de esta especie bacteriana en vegetales puede ser potencialmente peligrosa para la población de riesgo.

Pseudomonas monteilii es un microorganismo ambiental presente en entornos sanitarios, considerado como potencial patógeno al haberse aislado en diversas muestras clínicas. Su baja patogenicidad hace que sea relevante en infecciones de pacientes graves o portadores de catéteres (Toledo *et al.*, 2022). Se han detectado casos en España e India en los que esta bacteria ha sido responsable de meningoencefalitis (Gupta *et al.*, 2018; Toledo *et al.*, 2022). *Pseudomonas putida*, por su parte, se ha asociado también a infecciones nosocomiales en el ámbito hospitalario (Bao *et al.*, 2022).

C. gilardii ha sido aislado recientemente de muestras clínicas de diversos fluidos, por lo que se le está comenzando a considerar como un patógeno oportunista de baja patogenicidad en personas inmunocomprometidas o ancianas (Ruiz *et al.*, 2019). Las bacterias del género *Ochrobacterium* son microorganismos ambientales que se comportan como patógenos oportunistas, siendo capaces de causar infecciones asociadas al uso hospitalario de catéteres en personas inmunocomprometidas (Ryan y Pembroke, 2020; Yagel *et al.*, 2020). A pesar de su baja patogenicidad, pueden afectar también a personas inmunocompetentes provocando endocarditis o septicemia. En concreto, *Ochrobacterium intemedium* se ha identificado en casos de bacteriemia, absceso pélvico, neumonía y endocarditis (Ryan y Pembroke, 2020).

Teniendo en cuenta que ninguna de las bacterias aisladas pertenece a la familia Enterobacteriaceae, siendo estas anaerobias facultativas, y que la mayoría o todas las bacterias aisladas son aerobias estrictas, debería estudiarse la posibilidad de cultivar el APT incubada con el vegetal en anaerobiosis para evitar el crecimiento de bacterias que no resultan de interés para el trabajo, así como favorecer el crecimiento de Enterobacterias que queden opacadas por otras bacterias con mayor presencia y capacidad de diseminación, tal y como se hace en el trabajo de Van Hoek *et al.* (2015).

a. Clasificación de los aislados en función del vegetal

S. maltophilia es la bacteria mayoritaria en kale (50 %) y rúcula (42 %), mientras que *Pseudomonas* spp. lo es en lechuga (46 %) y chufa (64 %). En espinaca se encuentran ambas especies de forma mayoritaria en la misma proporción (30 %). No obstante, las dos especies bacterianas están presentes y son las más frecuentes en todos los vegetales, de modo que ambas en conjunto representan entre un 60 % (en espinaca) y un 84 % (en lechuga y chufa) del total de aislados para cada vegetal. Destaca también la frecuencia de *C. gilardii* en kale y espinaca, donde supone el 25 % y 20 % respectivamente de los aislados totales en dicho vegetal, si bien está totalmente ausente en lechuga y rúcula. *Acinetobacter* spp. tiene una presencia minoritaria en lechuga, espinaca y rúcula (8, 10 y 17 % respectivamente), siendo totalmente ausente en kale y chufa. Todos estos datos se reflejan gráficamente en la **Figura 5**.

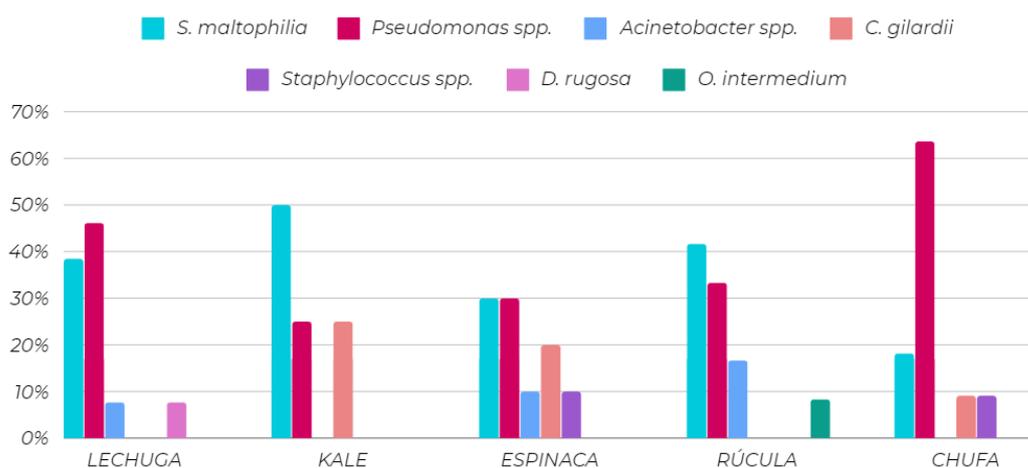


Figura 5. Proporción que representa cada especie bacteriana aislada frente al total de aislados en cada uno de los vegetales estudiados. Fuente propia.

El tipo de bacterias encontradas en cada vegetal, así como su frecuencia, fue bastante similar en todos los vegetales estudiados, si bien la diferencia más grande se dio entre los vegetales de hoja y la chufa: el tubérculo tuvo una menor presencia de *S. maltophilia* (20 %, frente a un 40 % de media del resto de vegetales), y una presencia de *Pseudomonas* spp. bastante superior a la de otras verduras (64 %, duplicando la media del 32 % de las verduras de hoja). Por otra parte, la presencia de *C. gilardii* fue relevante en kale y espinaca, siendo un 25 % y 20 % respectivamente de los aislados totales de cada vegetal. Resultó notorio que esta bacteria no estuvo presente ni en lechuga ni en rúcula.

b. Clasificación de los aislados en función del tipo de cultivo

La bacteria mayoritaria en el cultivo ecológico resultó ser *S. maltophilia* (39 %), seguida por *Pseudomonas* spp. (37 %), mientras que en el cultivo convencional fue *Pseudomonas* spp. con un 50 % de los aislados de este género, seguida por *S. maltophilia* en un 25 %, tal y como se refleja en la **Figura 6**. Por tanto, se puede apreciar que mientras que ambos grupos bacterianos son prácticamente igual de comunes en cultivo ecológico, en el cultivo convencional se encuentran el doble de aislados de *Pseudomonas* spp. que de *S. maltophilia*. La gran frecuencia de *S. maltophilia* en cultivo ecológico contrasta con los resultados del trabajo de Rico y Falomir (2020), que no identificaron esta bacteria en ninguno de los vegetales ecológicos que estudiaron.

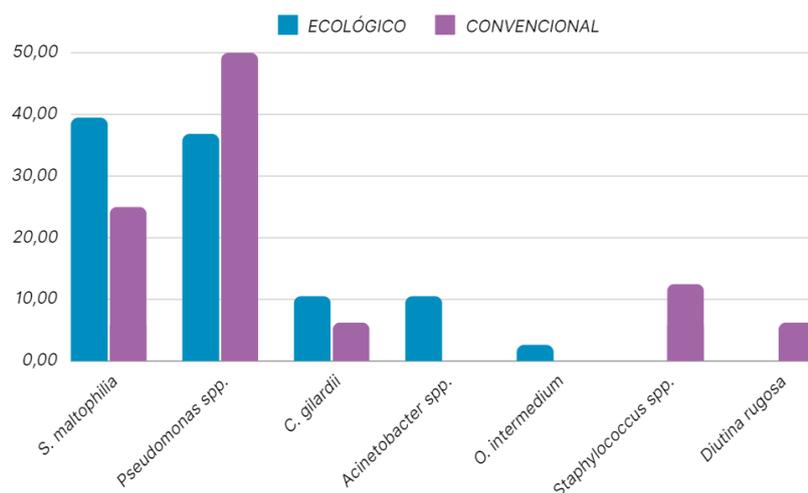


Figura 6. Distribución porcentual de cada especie o género bacteriano sobre el total de aislados de cada tipo de cultivo. Fuente propia.

C. gilardii se encuentra aproximadamente en la misma proporción en ambos tipos de cultivo. Por otra parte, destaca que las bacterias del género *Acinetobacter* suponen un 10,5 % de los aislados de cultivo ecológico, y no están representadas en el cultivo tradicional (**Figura 6**). Lo mismo ocurre con *O. intermedium*, si bien el porcentaje de esta bacteria es muy inferior (2,6 %). Por el contrario, aunque se han identificado aislados del grupo *Staphylococcus* en cultivo convencional, este género no aparece en el cultivo ecológico.

2. ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLADOS

2.1. Patrones de resistencia de los aislados

Para el estudio de la AMR de las cepas aisladas de vegetales se descartaron aquellas que no fueran de interés para el trabajo: la cepa P16.2 por ser una levadura sin interés, y las cepas P11.3 y P17.1 por ser bacterias Gram positivas y, por tanto, no ser tratadas con antibióticos β -lactámicos en la clínica. De este modo, se estudió la sensibilidad a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos de 51 cepas bacterianas. Por otro lado, como todas eran no-fermentadoras, se usaron los valores de *Pseudomonas spp.* (EUCAST, 2024) y *Acinetobacter spp.* (CLSI, 2023) como punto de corte para determinar la resistencia o sensibilidad a los antibióticos.

Algunas de las bacterias identificadas poseen resistencia intrínseca a algunos de los antibióticos estudiados. La resistencia intrínseca se define según el CLSI como “la resistencia innata o inherente, y no adquirida, a antimicrobianos” (2023). Este organismo recoge en su normativa sobre pruebas de sensibilidad que *S. maltophilia* es resistente de forma intrínseca cefotaxima, imipenem y meropenem entre otros, que son 3 de los 4 antibióticos estudiados en el proyecto (CLSI, 2023). Esto puede deberse a una menor permeabilidad de membrana, la presencia de bombas de flujo que externalizan los antibióticos, la presencia de β -lactamasas cromosómicas y otros genes de resistencia en plásmidos, y la capacidad de esta bacteria para modificar los antibióticos (Brooke, 2021). En consecuencia, estas resistencias no fueron tenidas en cuenta a la hora de contabilizar las resistencias que poseía cada aislado bacteriano, ni se incluyeron en el patrón de resistencias de las cepas.

Tabla 4. Patrones de resistencia que muestran los 51 aislados estudiados, contabilizando el número de cepas que presenta cada uno de ellos.

Patrones de resistencia	Número de cepas	Cepas
IMP	1	P27.1
MEM	3	P13.1, P14.1, P40.1
CTX	1	P27.2
CAZ	3	P2.3, P7.3, P8.2,
IMP – MEM	5	P14.3, P20.1, P33.1, P35.1, P37.3
CTX – CAZ	2	P6.3, P31.1
MEM – CTX	2	P8.3, P15.3
IMP – MEM – CTX	5	P4.1, P7.2, P16.3, P19.2, P25.1
IMP – MEM – CAZ	3	P2.1, P5.1, P19.1
MEM – CTX – CAZ	2	P6.1, P11.1

27

De las 51 cepas estudiadas, 24 no se consideran resistentes (47,1 %). En el caso de 8 de ellas se debe a que realmente no mostraron resistencia a antibióticos en la prueba de difusión, mientras que otras 16 son cepas de *S. maltophilia* con resistencia intrínseca a IMP, MEM y CTX (que no son consideradas), y sensibilidad hacia CAZ. Las 27 cepas restantes poseyeron al menos una resistencia (52,4 % de los aislados), cuyos patrones de resistencia se recogen en la **Tabla 4**. Desglosando este dato en función del número de resistencias, se observa que el 15,7 % de los aislados tienen resistencia a un solo antibiótico, siendo MEM y CAZ los más usuales, el 17,6 % tienen resistencia a 2 antibióticos, donde la combinación IMP+MEM es la más frecuente, y el 19,6 % de los aislados tienen 3 resistencias, siendo la combinación IMP+MEM+CTX la más habitual. Por el contrario, ninguno de los aislados mostró resistencia a los 4 antibióticos testados. Así, se observó que el suceso más común es que las bacterias presenten 3 resistencias (**Figura 7**).

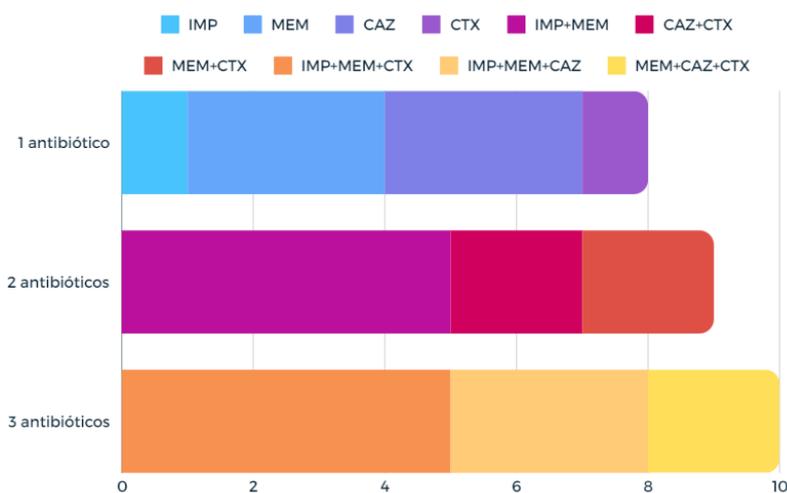


Figura 7. Distribución de la cantidad de aislados que presentan resistencia a cada uno de los antibióticos estudiados, ordenando los patrones de resistencia en función del número de antibióticos que contienen. Fuente propia.

La combinación de resistencias más habitual ha sido IMP+MEM. Cinco aislados presentaron este patrón en solitario, mientras que cinco aislados presentaban ambas resistencias adicionales a la resistencia

a CTX, y tres más con CAZ. De los aislados obtenidos, 13 poseían resistencia a ambos carbapenémicos, lo que resulta bastante perjudicial teniendo en cuenta que este grupo de antibióticos suponen una de las líneas de acción más importantes contra bacterias, especialmente contra aquellas productoras de ESBL (Wanger *et al.*, 2017). Por otra parte, el antibiótico al que más resistencia se ha observado ha sido MEM (20 aislados poseen esta resistencia). Considerando el uso de este antibiótico en el APT inicial para la selección de bacterias potencialmente resistentes en vegetales, es un dato esperable. El hecho de haber aislado bacterias que no sean resistentes a MEM, pero que hayan sobrevivido durante su cultivo en medio selectivo con este antibiótico, se debe a que la cantidad de MEM empleada en el medio fue muy reducida, lo que permite hacer una ligera selección de bacterias resistentes permitiendo también obtener algunas que sean medianamente sensibles. CAZ fue el antibiótico al que fueron sensibles un mayor número de aislados, seguido de CTX, por lo que las cefalosporinas de tercera generación serían la mejor opción de tratamiento contra las bacterias encontradas. De igual forma, en el trabajo de Rico y Falomir (2020) se detectó que las resistencias a C3G eran poco frecuentes (0-3 %), aunque en este caso la incidencia ha sido algo mayor (19,6 % y 23,5 % respectivamente).

a. Distribución de las resistencias dependiendo del tipo de cultivo y vegetal

De los 38 aislados totales procedentes de cultivo ecológico, el 55,3 % presentaron alguna resistencia (21 de ellos), mientras que en el cultivo convencional el 46,2 % de los aislados (6 de 13) poseía alguna resistencia. Por tanto, la presencia de bacterias resistentes es ligeramente superior en cultivo ecológico, si bien no se puede asegurar con certeza debido al menor número de muestras vegetales convencionales empleadas. Este resultado es opuesto al obtenido por Rico y Falomir (2020), quienes encontraron una mayor proporción de aislados resistentes en cultivo convencional y que, por tanto, afirmaban que el cultivo ecológico ayuda a disminuir la selección y diseminación de ARB. Por otro lado, y teniendo en cuenta que la diferencia porcentual de aislados resistentes entre ambos tipos de cultivo no es excesivamente amplia, se podrían apoyar las conclusiones obtenidas por Jiménez-Belenguer *et al.* (2023), quienes no encontraron diferencias significativas entre aislados de vegetales ecológicos y convencionales. Esta disonancia entre estudios pone de manifiesto la necesidad de elaborar nuevos trabajos que amplíen el tamaño muestral, así como los antibióticos analizados, para poder obtener conclusiones determinantes.

Entre los aislados resistentes procedentes de cultivo ecológico se encontró la misma proporción de ellos con resistencias a uno, dos y tres antibióticos: el 33,3 % de los ellos ($n=7$) presenta una, dos y tres resistencias, a diferencia del trabajo de Rico y Falomir (2020), donde eran más comunes los aislados con una sola resistencia. En el cultivo convencional sí se apreciaron ligeras diferencias: el 50 % de los aislados resistentes poseían resistencia a 3 antibióticos ($n=3$), el 33,3 % a dos ($n=2$), y el 16,7 % a uno ($n=1$), si bien la escasa muestra de vegetales convencionales dificulta obtener conclusiones fiables.

De entre las verduras de cultivo ecológico, destacó la gran proporción de aislados resistentes en kale (83 %, 5 de 6), espinaca (66 %, 6 de 9) y rúcula (60 %, 6 de 10), mientras que fueron más reducidas en lechuga (37 %, 3 de 8) y chufa (20 %, 1 de 5) (**Figura 8**). Se adquirieron menos aislados resistentes de los vegetales de cultivo convencional, de hecho, no se obtuvo ninguna bacteria resistente procedente de kale y espinaca convencionales, mientras que se identificó tan solo una en lechuga (que supone el

25 % de los aislados de lechuga convencional) y otra en rúcula (50 % de los aislados obtenidos de rúcula convencional, que fueron 2). De nuevo se subraya la necesidad de usar un mayor número de vegetales para el estudio.

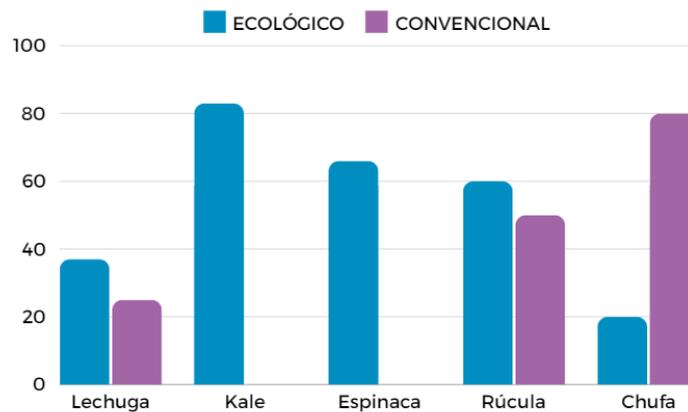


Figura 8. Porcentaje de los aislados de cada tipo de verdura y cultivo que presentan resistencia al menos a un antibiótico. Fuente propia.

En el caso de la chufa convencional es destacable que el 80 % de los aislados (1 de cada 5) eran resistentes a antibióticos, frente al 20 % de la chufa ecológica. En este caso sí se pueden comparar ambos resultados, al haber estudiado la misma cantidad de tubérculos de ambos tipos. Así, se puede afirmar que la chufa convencional contiene más bacterias resistentes a carbapenémicos y C3G que la ecológica, a falta de futuros trabajos con mayor tamaño de estudio que lo confirmen.

b. Distribución de las resistencias en función de la especie bacteriana

Pseudomonas ha sido el género bacteriano con mayor número de aislados resistentes, ya que 14 de las 22 identificadas lo fueron (63,6 %). No obstante, las especies con un mayor porcentaje de bacterias aisladas resistentes fueron *Acinetobacter* spp., y *Cupriavidus gilardii*, ya que la totalidad (100 %) de las bacterias de ambas especies resultaron resistentes como mínimo a uno de los antibióticos testados.

Todas las *Pseudomonas* aisladas resistentes mostraron resistencia al menos a uno de los antibióticos carbapenémicos, y un gran número de ellas presentó la combinación de resistencia a IMP y MEM, lo que supone una preocupación ya que los antibióticos carbapenémicos son una importante línea de acción actualmente. Todos los aislados de *Pseudomonas* fueron sensibles a CAZ, a excepción de uno, por lo que este antibiótico resultaría idóneo en caso de infección por *Pseudomonas*. Las bacterias del género *Acinetobacter* identificadas presentaron diferentes patrones de resistencia. Todas provenían de vegetales de cultivo ecológico, siendo más frecuentes en rúcula.

Tan solo se identificaron 3 aislados resistentes de *S. maltophilia*, lo que supone un 15,8 % de los 19 totales. Teniendo en cuenta que el único antibiótico que se evaluaba para *S. maltophilia* era CAZ, se puede apreciar que este tiene una gran efectividad y puede ser usado como tratamiento. Este hecho resulta muy favorable considerando que *S. maltophilia* posee resistencia intrínseca a numerosos antibióticos, y por tanto son muy reducidas las líneas de tratamiento disponibles (Brooke, 2021). En cuanto a *C. gilardii*, todos los aislados mostraron resistencia a ambos carbapenémicos estudiados, y algunos de ellos también a alguna de las C3G, principalmente a CAZ. Esto puede indicar que

probablemente *C. gilardii* posea resistencia intrínseca a carbapenémicos, tal y como estudiaron Ruiz *et al.* (2019) en su trabajo, donde analizaron el resistoma de cepas aisladas de aguas mediante la secuenciación de su genoma. De ser así, se limitaría en gran medida las opciones de tratamiento en caso de infección. Por último, la única cepa aislada de *O. intermedium* mostró una gran resistencia a CTX y CAZ, acorde a al trabajo de Ryan y Pembroke (2020) donde se afirma que las bacterias del género *Ochrobacterium* son resistentes a la mayoría de C3G, y sensibles a carbapenémicos. Por ello, en este caso los antibióticos carbapenémicos sí resultarían útiles ante infecciones hospitalarias.

2.2. Estudio de la producción de ESBL de los aislados

El uso de antibióticos C3G en combinación con ácido clavulánico en los antibiogramas permite conocer si las bacterias producen ESBL. Si el tamaño del halo en el disco con ácido clavulánico es al menos 5 mm mayor que el disco sin ácido clavulánico, se puede afirmar que la bacteria produce ESBL (EUCAST, 2017). Este criterio se cumplió en 38 aislados en el caso de CTL, y 3 aislados en el caso de CAL. Por tanto, el 74,5 % de los aislados poseen ESBL contra CTX, y el 5,9 % contra CAZ, siendo relevante que todos los casos de ESBL de resistencia a CAZ proceden de aislados de verduras ecológicas y cuentan también con ESBL de resistencia a CTX. El gran porcentaje de aislados con ESBL obtenidos es significativamente superior al obtenido en otros trabajos, como el de Jiménez-Belenguer *et al.* (2023) donde encontraron ESBL únicamente en el 13 % de los aislados, o el de Reuland *et al.* (2014), donde se detectaron ESBL en el 6 %. Sin embargo, las diferencias en los protocolos seguidos y las especies bacterianas aisladas en cada proyecto pueden explicar estas grandes disparidades.

Es destacable que 18 de las 19 cepas aisladas de *S. maltophilia* (94,7 %) poseían ESBL de resistencia a cefotaxima, a pesar de que esta especie tiene resistencia intrínseca a CTX gracias a los mecanismos moleculares de los que dispone. 4 de las 5 cepas aisladas (80 %) de *C. gilardii*, 14 de las 18 cepas aisladas de *Pseudomonas* spp. (77,8 %), y la única cepa aislada de *O. intermedium* poseían también ESBL. Por otra parte, no todos los aislados que presentaban ESBL se consideraban resistentes a cefotaxima, sino que el 31,6 % de ellos era sensible a dicho antibiótico. A pesar de contener el ARG, probablemente no esté siendo aún expresado para conferir resistencia, sino que podría comenzar a hacerlo cuando se active por sufrir presión selectiva. El alto porcentaje de bacterias aisladas con ESBL contra cefotaxima resulta preocupante, pues muestra la alta prevalencia de este tipo de enzimas en microorganismos que se encuentran en vegetales frescos de gran consumo, lo que puede favorecer la propagación de estos ARG en el medioambiente.

Es relevante que todos los aislados procedentes de rúcula, tanto ecológica como convencional, poseían ESBL contra CTX, así como el 89 % de los aislados procedentes de espinaca. Ambos vegetales destacan por su alta prevalencia en bacterias productoras de ESBL, mientras que en lechuga, kale y chufa, el 75, 50 y 60 % respectivamente de los aislados producían ESBL. En cuanto al tipo de cultivo, se encontraron ESBL en el 76 y 76,9 % de los aislados de cultivo ecológico y convencional respectivamente, por lo que apenas se observa diferencia entre ambas, al contrario que ocurre en el trabajo de Zhu *et al.* (2017), donde se detectó una presencia superior de ARG en aislados de cultivo ecológico. La reducida muestra empleada impide hacer un estudio estadístico fiable que determine si

las diferencias entre vegetales y tipos de cultivo son significativas, por lo que sería necesario hacer nuevos estudios en el futuro con un mayor tamaño muestral.

Por otra parte, la baja presencia de ESBL que degraden ceftazidima supone un alivio por la escasa presencia de este tipo de enzimas peligrosas para la efectividad de los tratamientos clínicos. No obstante, numerosos aislados presentan resistencia a ceftazidima, lo que significa que hay otros mecanismos implicados en la resistencia a este antibiótico que deben ser estudiados, y que la combinación de ácido clavulánico con CAZ puede no ser efectivo en la mayoría de los casos.

3. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AISLADOS

La detección de genes de resistencia a antibióticos se llevó a cabo mediante PCR múltiple y posterior electroforesis de los amplicones para las 51 bacterias Gram negativas aisladas. Se testearon los 7 genes estudiados en todas las muestras, si bien se esperaba encontrar alguno de los genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC} o *bla*_{VIM} en las cepas resistentes a carbapenémicos, y los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} o *bla*_{CMY-2} en alguna de las cepas resistentes a C3G.

A pesar de seguir rigurosamente los protocolos establecidos y emplear el material necesario, todos los resultados obtenidos en la electroforesis fueron negativos, de modo que no se observaron bandas que confirmaran la presencia de los ARG estudiados en ninguna de las muestras (**Figura 9**). Se repitió el mismo protocolo para los 7 genes y 51 muestras, de modo que se llevaron a cabo varias electroforesis que abarcaran todos los casos, obteniendo el mismo resultado en todos ellos: no se observaban bandas en el gel para los tamaños que deberían tener los amplicones de los ARG, al contrario que ocurría en estudios similares como el de Jiménez-Belenguer *et al.* (2023) o el de Rico y Falomir (2020), donde se identificaron varios genes de resistencia. No obstante, en todas las electroforesis se pudo apreciar como todos los controles positivos empleados sí se observaban en forma de una banda brillante, y el control negativo fue negativo también en todos los casos para descartar que hubiera contaminación (**Figura 9**). Esto confirma que los reactivos del mix de reacción sí se encontraban en perfecto estado, y que las condiciones de PCR y electroforesis fueron adecuadas.

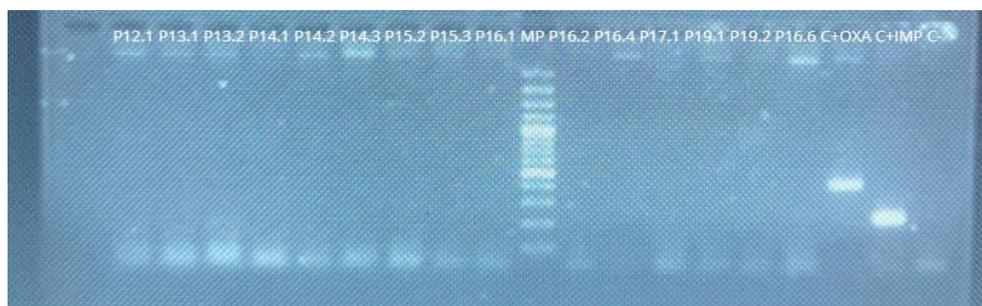


Figura 9. Electroforesis en gel para estudiar los ARG *bla*_{OXA} y *bla*_{IMP} en las muestras que se indican. El pocillo MP corresponde al marcador de pesos moleculares. Los tres últimos pocillos contienen los controles: C+OXA corresponde el control positivo para *bla*_{OXA}, C+IMP corresponde al control positivo para *bla*_{IMP}, y C- corresponde al control negativo, para el que se empleó agua MiliQ. Fuente propia.

Por otro lado, se comprobó la calidad del ADN extraído para descartar que se hubiera deteriorado. Se midió su concentración y pureza mediante el espectrómetro Nanodrop, resultando idóneo en todos los

casos. Se testó también la calidad del ADN corriéndolo puro en un gel de electroforesis para observar si existía degradación, pero en todos los casos se observó tan solo una banda en lo alto del gel, que demostraba la integridad del ADN.

Esto da lugar a dos hipótesis: o bien los ARG buscados están presentes en algunas muestras, pero su concentración es inferior al umbral de detección de la PCR y/o de la electroforesis, lo que impide que se amplifiquen o se observen; o bien todas las muestras son verdaderamente negativas para los genes estudiados, habiendo varias posibles causas para ello.

El primer caso resulta bastante probable, sobre todo teniendo en cuenta que algunos ARG pueden localizarse en plásmidos pequeños o que no se expresan. Para subsanar este problema sería necesario buscar métodos alternativos de detección; sería idóneo emplear PCR cuantitativa (qPCR) por ser más sensible, tal y como se hace en el trabajo de Gao *et al.* (2020). También podrían secuenciarse los amplicones, como se hace en los trabajos de Zurfluh *et al.* (2015) y Van Hoek *et al.* (2015), o incluso secuenciarse el genoma mediante técnicas de secuenciación de tercera generación, que podrían concluir si los genes están o no presentes con una gran fiabilidad. Además, podrían identificar muchos otros genes de resistencia a la vez.

Existen numerosas razones que pueden explicar que todas las muestras sean negativas para los genes buscados. En primer lugar, en el estudio se busca una reducida cantidad de los ARG existentes codificantes para carbapenemasas o ESBL, si bien hay otros muchos genes conocidos que no han sido incluidos en el proyecto. Se ha examinado tan solo un gen de cada una de las familias *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, pero existen muchos otros genes en cada familia. Además, se conocen también otros tipos de genes de ESBL o carbapenemasas como *bla*_{NDM}, *bla*_{ACC}, *bla*_{ADD}, *bla*_{FLC}, *bla*_{FRI}, *bla*_{RAHN}, o *bla*_{FONA} entre otros (Taggar *et al.*, 2020; Chelaghma *et al.*, 2021). Por tanto, las resistencias identificadas podrían ser causadas por alguno de los genes que no se han considerado. Por otra parte, los ARG incluidos en el estudio lo fueron por ser habituales en Enterobacterias, que son el tipo bacteriano que se buscaba aislar principalmente de vegetales para este proyecto. Sin embargo, al haberse obtenido aislados de otras familias y géneros, es coherente que estos presenten otro tipo de genes de resistencia acordes a su especie. En el caso de *S. maltophilia*, se han encontrado principalmente los genes *bla*_{L1} y *bla*_{L2} que confieren resistencia a β-lactámicos, el primero de ellos incluso a carbapenémicos (Brooke, 2021). En *Pseudomonas putida* aislada de muestras clínicas de han identificado los ARG *bla*_{PME}, *bla*_{CARB} y *bla*_{NDM} (Bao *et al.*, 2022). Todos estos genes resultan de interés para ser estudiados en los aislados obtenidos en futuros trabajos. Los genes *bla*_{GES} se han localizado en países europeos, presente tanto en Enterobacterias como en *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, por lo que también podrían haber sido incluidos en el presente estudio, o podrían ser examinados en un futuro (Halat *et al.*, 2016).

Por otra parte, existen diversos mecanismos de resistencia al margen de la presencia de ARG, tal y como se comenta en el presente trabajo. Es posible que algunas de las resistencias fenotípicas a antibióticos observadas en las cepas aisladas no se deban a la presencia de ARG, sino que sean causadas por otras herramientas moleculares. De esta forma, las resistencias se podrían fundamentar en una baja permeabilidad de la membrana plasmática que impide el paso de la mayoría de las sustancias, en bombas de flujo que externalizan los fármacos que buscan entrar al interior celular, en la modificación

de las dianas sobre las que actúan los antibióticos, o la modificación de los compuestos en sí mediante ataques químicos a los mismos.

V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha evaluado la presencia de ARB en verduras de cultivo ecológico y convencional obtenidas de la huerta valenciana, así como sus patrones de resistencia a antibióticos carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación.

Se encontró que la lechuga y rúcula poseen un mayor contenido de bacterias posiblemente resistente a antibióticos carbapenémicos. No se detectaron Enterobacterias, lo que disminuye el riesgo de ciertas enfermedades alimentarias. No obstante, se hallaron patógenos oportunistas como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. o *C. gilardii*, que pueden provocar enfermedades a personas inmunocomprometidas, y también contribuir a la diseminación de genes de resistencia.

Más de la mitad de los aislados eran resistentes al menos a uno de los antibióticos, siendo más común la resistencia a 3 antibióticos. Esto confirma que los vegetales pueden ser reservorios de ARB. Gran parte de los aislados presentaba resistencia a uno o ambos carbapenémicos, lo que sugiere una disminución de la eficacia de estos fármacos, que actualmente son una de las principales líneas de tratamiento contra bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas o bacterias que poseen ESBL, y pone de manifiesto la necesidad de encontrar tratamientos alternativos que puedan sustituir el papel de los carbapenémicos. Por otra parte, CAZ demostró ser el antibiótico más efectivo y con una menor tasa de resistencia. En concreto resultó muy efectivo para la mayoría de las cepas de *S. maltophilia*, que posee resistencia a numerosos antibióticos, además de contra gran parte de *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp.

Se ha detectado un porcentaje ligeramente mayor de ARB en vegetales de hoja de cultivo ecológico en comparación con los convencionales, mientras que la chufa convencional contenía una cantidad verdaderamente superior de ARB que la ecológica. No obstante, estos datos necesitan ser reforzados por futuros estudios que incrementen el número de muestras estudiadas, equilibrando las cifras de ambos tipos de cultivo.

Tres cuartas partes de los aislados producían ESBL para CTX, mientras que la producción de estas enzimas contra CAZ fue minoritaria. Por ello, CAZ resulta un antibiótico óptimo para ARB. No obstante, el uso de CAZ en combinación con ácido clavulánico probablemente no sea efectivo para aquellas bacterias resistentes a CAZ, pues su resistencia no suele estar mediada por ESBL, sino por otros mecanismos.

No ha sido posible la detección de ARG en los aislados mediante PCR y electroforesis, por lo que es necesario emplear nuevas técnicas con límites de detección más sensibles en un futuro. Además, sería conveniente incluir en el estudio aquellos ARG más encontrados en las bacterias aisladas identificadas para optimizar los resultados.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ALÓS, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- BAO, D., HUANG, L., YAN, J., LI, Y., RUAN, Z., & JIANG, T. (2022). First Identification of a Multidrug-Resistant *Pseudomonas putida* Co-Carrying Five β -Lactam Resistance Genes Recovered from a Urinary Tract Infection in China. *Infection And Drug Resistance*, Volume 15, 2229-2234. <https://doi.org/10.2147/idr.s366567>
- BASSETTI, M., MERELLI, M., TEMPERONI, C., & ASTILEAN, A. (2013). New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials*, 12(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-22>
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., & TURCK, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4_ts), 493-496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- BROOKE, J. S. (2021). Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00030-19>
- BUSH, K., & BRADFORD, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- CALVO, J., & MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- CHELAGHMA, W., LOUCIF, L., BENDAHO, M., & ROLAIN, J. (2021). Vegetables and Fruit as a Reservoir of β -Lactam and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Review. *Microorganisms*, 9(12), 2534. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122534>
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). (2023). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Document M100; *Committee for Clinical Laboratory Standards*.
- COMISIÓN EUROPEA. (2024a). *Visión general de los productos ecológicos*. Agricultura. Disponible en: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/organic-farming/organics-glance_es
- COMISIÓN EUROPEA. (2024b). *Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo: Una visión a largo plazo para las zonas rurales de la UE*. EUR-Lex. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A52021DC0141R%2801%29>
- COMISIÓN EUROPEA. (2024c). *Producción y productos ecológicos*. Agricultura. Disponible en: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/organic-farming/organic-production-and-products_es
- COMISIÓN EUROPEA. (2024d). *El futuro de la agricultura ecológica*. Agricultura. Disponible en: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/organic-farming/future-organics_es
- COMISIÓN EUROPEA. (2024e). *Acción de la UE en materia de resistencia a antimicrobianos*. Public health. Disponible en: https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_en
- COMITÉ D'AGRICULTURA ECOLÒGICA COMUNITAT VALENCIANA (CAECV). (2022). *Informe del Sector Ecológico de la Comunitat Valenciana*. <https://www.bioecoactual.com/wp-content/uploads/2023/07/CAECV-informe-agricultura-ecologica-2022.pdf>
- CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA. (2024). *El Pacto Verde Europeo*. Disponible en: <https://www.consilium.europa.eu/es/policies/green-deal/>

- DARBY, E. M., TRAMPARI, E., SIASAT, P., GAYA, M. S., ALAV, I., WEBBER, M. A., & BLAIR, J. M. A. (2022). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews. Microbiology*, 21(5), 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- DE SOUSA OLIVEIRA, K., DE LIMA, L., COBACHO, N., DIAS, S., & FRANCO, O. (2016). Mechanisms of Antibacterial Resistance. En *Elsevier eBooks* (pp. 19-35). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803642-6.00002-2>
- ECOVALIA. (2023). *Informe anual 2024 Consumo y producción ecológicos*. Asociación Ecovalia. <https://ecovalia-repositorio-documental-web-2.s3.amazonaws.com/informe-anual-2024-ecovalia-consumo-produccion-ecologicos.pdf>
- EUCAST (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (Version 2.0) https://www.eucast.org/resistance_mechanisms
- EUCAST (2024). EUCAST: clinical breakpoints and dosing of antibiotics. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, & EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2024). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021–2022. *EFSA Journal*, 22(e8583). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8583>
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. (2022). *Antimicrobial Resistance in the EU/EEA: a One Health Response*. OECD. <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/topic/files/AMR-ECDC-Policy-Brief-2022.pdf>
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. (2024). *Foodborne zoonotic diseases*. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases>
- GAO, F., HE, L., HE, L., ZOU, H., ZHANG, M., WU, D., LIU, Y., SHI, Y., BAI, H., & YING, G. (2020). Untreated swine wastes changed antibiotic resistance and microbial community in the soils and impacted abundances of antibiotic resistance genes in the vegetables. *Science Of The Total Environment*, 741, 140482. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140482>
- GUPTA, V., SHARMA, S., SINGHAL, L., SONI, R., & CHANDER, J. (2018). *Pseudomonas Montelii* an Emerging Pathogen in Meningoencephalitis. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research*. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2018/32670.11437>
- HALAT, D., SARKIS, D., & MOUBARECK, C. (2016). Carbapenem-Resistant, Gram-Negative bacilli. *Elsevier eBooks* (pp. 93-119). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803642-6.00005-8>
- JIMÉNEZ-BELENQUER, A. I., FERRÚS, M. A., HERNÁNDEZ, M., GARCÍA-HERNÁNDEZ, J., MORENO, Y., & CASTILLO, M. Á. (2023). Prevalence and Characterization of Beta-Lactam and Carbapenem-Resistant Bacteria Isolated from Organic Fresh Produce Retailed in Eastern Spain. *Antibiotics*, 12(2), 387. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020387>
- KIM, D., KIM, S., KWON, Y., KIM, Y., PARK, H., KWAK, K., LEE, H., LEE, J. H., JANG, K., KIM, D., LEE, S. H., & KANG, L. (2023). Structural Insights for β -Lactam Antibiotics. *Biomolecules & Therapeutics*, 31(2), 141-147. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2023.008>
- KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J., & COLLINS, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(6), 423-435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>

- KOZAK, G. K., BOERLIN, P., JANECKO, N., REID-SMITH, R. J., & JARDINE, C. M. (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. <https://doi.org/10.1128/aem.01821-08>
- LEPE, J., & MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392-402. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
- MAZUR-WŁODARCZYK, K., & GRUSZECKA-KOSOWSKA, A. (2022). Conventional or Organic? Motives and Trends in Polish Vegetable Consumption. *International Journal Of Environmental Research And Public Health* (Online), 19(8), 4667. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084667>
- MIE, A., ANDERSEN, H. R., GUNNARSSON, S., KAHL, J., KESSE-GUYOT, E., REMBIAŁKOWSKA, E., QUAGLIO, G., & GRANDJEAN, P. (2017). Human health implications of organic food and organic agriculture: a comprehensive review. *Environmental Health* (London. 2002. Online), 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0315-4>
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2023). Análisis de la caracterización y proyección de la producción ecológica 2021. *Gobierno de España*. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion-eco/informecaracterizacion2021v3_tcm30-660216.pdf
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2024). *Producción ecológica*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion-eco/>
- MISNER, S., & ARMSTRONG FLORIAN, T. (2013). *Organic vs. conventional foods*. College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona Cooperative Extension. <https://cals.arizona.edu/pubs/health/az1603.pdf>
- OLAIMAT, A. N., Y HOLLEY, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, 32(1), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2007). *Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos*. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43634/9789243594637_spa.pdf
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2017). *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/311820/WHO-EMP-IAU-2017.12-eng.pdf?sequence=1>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2023a). *Enfermedades de transmisión alimentaria*. Disponible en: https://www.who.int/es/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2023b). *Listeriosis*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2024a). *Seguridad alimentaria*. Disponible en: https://www.who.int/es/health-topics/food-safety#tab=tab_1
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2024b). *Salmonella (no tifoidea)*. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2024c). *E. coli*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2024d). *Resistencia a los antimicrobianos*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2024e). *La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>

- PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO. (2003). *Reglamento (CE) n.º 1831/2003 sobre aditivos en la alimentación animal*. Diario Oficial de la Unión Europea, L268, 29-43. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32003R1831>
- PLAN NACIONAL RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS. (2023). *¿Quiénes somos?* Disponible en: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/quienes-somos>
- PLAN NACIONAL RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS. (2024). *Guía terapéutica antimicrobiana del SNS (salud humana)*. Disponible en: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/guia-terapeutica-antimicrobiana-del-sns-salud-humana>
- POIREL, L., WALSH, T. R., CUVILLIER, V., & NORDMANN, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119-123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO. (2024). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Disponible en <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals>
- REULAND, E. A., NAIEMI, N. A., RAADSEN, S. A., SAVELKOUL, P. H. M., KLUYTMANS, J. A. J. W., & VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. (2014). Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(10), 1843-1846. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2142-7>
- RICO, H., y FALOMIR, P. (2020). Comparison of the Antibiotic-Resistant *Enterobacteriaceae* Content in Conventional, Organic and Fresh-Cut Vegetables Sold in Valencia (Spain). *AIMS Agriculture And Food*, 5(2), 233-244. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2020.2.233>
- RUIJMY, R., BRISABOIS, A., BERNEDE, C., SKURNIK, D., BARNAT, S., ARLET, G., MOMCILOVIC, S., ELBAZ, S., MOURY, F., VIBET, M., COURVALIN, P., GUILLEMOT, D., & ANDREMONT, A. (2010). Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environmental Microbiology*, 12(3), 608-615. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02100.x>
- RUIZ, C., MCCARLEY, A., ESPEJO, M. L., COOPER, K. K., & HARMON, D. E. (2019). Comparative Genomics Reveals a Well-Conserved Intrinsic Resistome in the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen *Cupriavidus gilardii*. *MSphere*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/msphere.00631-19>
- RYAN, M. P., & PEMBROKE, J. T. (2020). The Genus *Ochrobactrum* as Major Opportunistic Pathogens. *Microorganisms*, 8(11), 1797. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111797>
- SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos*. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia/1a-edicion-1993-2002>
- SUN, Y., QIU, T., GAO, M., SHI, M., ZHANG, H., & WANG, X. (2019). Inorganic and organic fertilizers application enhanced antibiotic resistome in greenhouse soils growing vegetables. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 179, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.039>
- TAGGAR, G., RHEMAN, M. A., BOERLIN, P., & DIARRA, M. S. (2020). Molecular Epidemiology of Carbapenemases in Enterobacteriales from Humans, Animals, Food, and the Environment. *Antibiotics*, 9(10), 693. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100693>
- TANG, K. W. K., MILLAR, B. C., & MOORE, J. E. (2023). Antimicrobial resistance (AMR). *British Journal Of Biomedical Science*, 80. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>

- TOLEDO, H., MARTÍN-GUTIÉRREZ, G., & LEPE, J. A. (2022). Meningitis nosocomial por *Pseudomonas monteilii* en paciente portador de catéter intraventricular. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 40(2), 92-93. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.01.003>
- UDDIN, T. M., CHAKRABORTY, A. J., KHUSRO, A., ZIDAN, B. R. M., MITRA, S., EMRAN, T. B., DHAMA, K., RIPON, K. H., GAJDÁCS, M., SAHIBZADA, M. U. K., HOSSAIN, J., & KOIRALA, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal Of Infection And Public Health*, 14(12), 1750-1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- VAN HOEK, A. H., VEENMAN, C., VAN OVERBEEK, W. M., LYNCH, G., DE RODA HUSMAN, A. M., & BLAAK, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014>
- WANGER, A., CHAVEZ, V., HUANG, R. S., WAHED, A., ACTOR, J. K., & DASGUPTA, A. (2017). Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs. *Elsevier eBooks* (pp. 119-153). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805351-5.00007-7>
- XU, L., QIAN, Y., SU, C., CHENG, W., LI, J., WAHLQVIST, M. L., & CHEN, H. (2016). Prevalence of bacterial resistance within an eco-agricultural system in Hangzhou, China. *Environmental Science And Pollution Research International*, 23(21), 21369-21376. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7345-2>
- YAGEL, Y., SESTITO, S. R., MOTRO, Y., SHNAIDERMAN-TORBAN, A., KHALFIN, B., SAGI, O., NAVON-VENEZIA, S., STEINMAN, A., & MORAN-GILAD, J. (2020). Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance, Virulence, and Phylogeny of the Genus *Ochrobactrum*. *Antibiotics*, 9(4), 177. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040177>
- ZHU, B., CHEN, Q., CHEN, S., & ZHU, Y. (2017). Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced? *Environment International*, 98, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.001>
- ZURFLUH, K., NÜESCH-INDERBINEN, M., MORACH, M., BERNER, A. Z., HÄCHLER, H., & STEPHAN, R. (2015). Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Vegetables Imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Applied And Environmental Microbiology*, 81(9), 3115-3120. <https://doi.org/10.1128/aem.00258-15>

ANEXOS

ANEXO I a. Cepas bacterianas identificadas de cada género y especie, y recuento de las mismas.

Género	Especie	Recuento	Cepas
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	19	P2.3, P3.3, P7.3, P8.2, P9.1, P12.1, P13.2, P14.2, P15.2, P16.4, P26.1, P28.2, P29.1, P31.3, P32.1, P34.1, P38.1, P39.1, P41.2
<i>Pseudomonas</i>	spp.	17	P6.1, P14.3, P16.1, P16.3, P19.2, P21.1, P24.1, P25.1, P27.1, P29.2, P31.4, P33.1, P35.1, P37.1, P37.3, P40.1, P41.1
	<i>monteilii</i>	4	P8.3, P10.1, P13.1, P15.3,
	<i>putida</i>	1	P11.1
<i>Acinetobacter</i>	<i>lactucae</i>	2	P6.3, P7.2
	<i>pittii</i>	2	P14.1, P27.2
<i>Cupriavidus</i>	<i>gilardii</i>	5	P2.1, P4.1, P5.1, P19.1, P20.1
<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>	1	P17.1
	<i>epidermidis</i>	1	P11.3
<i>Ochrobactrum</i>	<i>intermedium</i>	1	P31.1
<i>Diutina</i>	<i>rugosa</i>	1	P16.2
		54	

ANEXO I b. Número de aislados de cada especie bacteriana identificados en cada vegetal en función de su tipo y forma de cultivo.

		TIPO DE CULTIVO	
		Ecológico	Convencional
TIPO DE VEGETAL	Lechuga	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (3): P3.3, P13.2, P29.1, • <i>Pseudomonas</i> spp (3): P6.1, P24.1, P29.2 • <i>Pseudomonas monteilii</i> (1): P13.1 • <i>Acinetobacter lactucae</i> (1): P6.3 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2): P16.4, P32.1 • <i>Pseudomonas</i> spp. (2): P16.1, P16.3 • <i>Diutina rugosa</i> (1): P16.2
	Kale	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (3): P2.3, P8.2, P26.1 • <i>Cupriavidus gilardii</i> (2): P2.1, P20.1 • <i>Pseudomonas monteilii</i> (1): P8.3 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1): P41.2 • <i>Pseudomonas</i> spp. (1): P41.1
	Espinaca	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (3): P12.1, P14.2, P28.2 • <i>Cupriavidus gilardii</i> (2): P4.1, P19.1 • <i>Pseudomonas</i> spp (3): P14.3, P19.2, P25.1 • <i>Acinetobacter pittii</i> (1): P14.1 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus warneri</i> (1): P17.1
	Rúcula	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (4): P7.3, P9.1, P31.3, P38.1 • <i>Pseudomonas</i> spp. (3): P27.1, P31.4, P33.1 • <i>Acinetobacter lactucae</i> (1): P7.2 • <i>Acinetobacter pittii</i> (1): P27.2 • <i>Ochrobacterium intermedium</i> (1): P31.1 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1): P39.1 • <i>Pseudomonas</i> spp. (1): P40.1
	Chufa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2): P15.2, P34.1 • <i>Pseudomonas</i> spp. (1): P21.1 • <i>Pseudomonas monteilii</i> (2): P10.1, P15.3 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cupriavidus gilardii</i> (1): P5.1, • <i>Pseudomonas</i> spp. (3): P35.1, P37.1, P37.3 • <i>Pseudomonas putida</i> (1): P11.1 • <i>Staphylococcus epidermidis</i> (1): P11.3

ANEXO II. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				x
ODS 2. Hambre cero.	x			
ODS 3. Salud y bienestar.	x			
ODS 4. Educación de calidad.				x
ODS 5. Igualdad de género.				x
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.			x	
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				x
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				x
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				x
ODS 10. Reducción de las desigualdades.		x		
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				x
ODS 12. Producción y consumo responsables.	x			
ODS 13. Acción por el clima.	x			
ODS 14. Vida submarina.				x
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				x
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				x
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.			x	

Este trabajo se fundamenta principalmente en los ODS 2, 3, 12 y 13, por estudiar una forma de consumo más respetuosa con el medioambiente y con las personas, que busca disminuir la huella de carbono y hacer una gestión más eficiente de los recursos. Del mismo modo, con este trabajo se busca valorar la salubridad y seguridad que proporcionan algunos alimentos de consumo en crudo, lo que contribuye a la salud y seguridad alimentaria de los consumidores.