



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Estudio de las resistencias a antibióticos carbapenémicos  
en muestras y aislados de vegetales procedentes de cultivo  
ecológico.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Alonso Marques, Isabel

Tutor/a: Castillo López, M<sup>a</sup> Ángeles

Cotutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Director/a Experimental: GARCIA FERRUS, MIGUEL

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio  
Natural

---

ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS  
CARBAPENÉMICOS EN MUESTRAS Y AISLADOS DE  
VEGETALES PROCEDENTES DE CULTIVO ECOLÓGICO

---

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Alumna: Isabel Alonso Marqués

Tutora: M<sup>a</sup> Ángeles Castillo López

Co-tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Valencia, septiembre 2022

# Estudio de las resistencias a antibióticos carbapenémicos en muestras y aislados de vegetales procedentes de cultivo ecológico.

## Resumen

Las bacterias resistentes a antibióticos (ARB) son una amenaza emergente para la salud humana, animal y ambiental. Su introducción en la cadena alimentaria tiene consecuencias a nivel de 'One Health'. Dentro de estos patógenos, los gram negativo de resistencia a carbapenemes son considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de crítica prioridad. Esto se debe a que los antibióticos carbapenémicos representan actualmente el agente más activo y potente contra patógenos gram negativos con resistencias a múltiples drogas (MDR) y no hay alternativas de tratamiento eficaces. Además, la incidencia de dichos patógenos ha aumentado en el último siglo y su infección se asocia a una tasa alta de mortalidad.

La situación se agrava con la tendencia al alza del consumo de vegetales orgánicos y crudos, que al no ser tratados ni cocinados pueden ser un potencial reservorio de vectores bacterianos. En los últimos cinco años el crecimiento del gasto en productos ecológicos en España según el Ministerio de Agricultura y Pesca ha sido del 67,42%.

En este trabajo se evaluaron muestras de espinaca, lechuga, col lombarda, col rizada y fresas de cultivos ecológicos de diferentes establecimientos minoristas de Valencia, con tal de determinar su papel en la transmisión de bacterias resistentes a antibióticos y sus genes.

En primer lugar, se analizó la calidad microbiológica de las muestras a través de recuentos de microorganismos clave en el análisis higiénico sanitario (microorganismos viables aerobios mesófilos, coliformes totales y *Escherichia coli*). Los niveles encontrados solo fueron alarmantes para dos muestras, una de lechuga y otra de espinaca, en las cuales se superó los límites preestablecidos de *E. coli*.

A continuación, se identificaron los aislados sospechosos de ser resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenemes, antibióticos de la familia de los  $\beta$ -lactámicos. Tras ello, se determinaron sus perfiles de resistencia a través del método de antibiograma disco-placa, detectándose aproximadamente un 9 % de bacterias con multiresistencia.

Para elucidar el origen de las resistencias, se estudió la presencia de genes de resistencia a carbapenemes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*) en las muestras y en los aislados. Dos de ellos, se detectaron en las muestras procedentes de TSB y tres en las cepas.

Los resultados manifiestan el riesgo que conlleva el consumo en crudo de estos alimentos y la necesidad de lavarlos previamente a su ingesta. También reflejan el *status quo* de la prevalencia de ARB y ARG y el imperativo de establecer medidas de supervisión epidemiológica y de disminución de consumo de antibióticos.

**Palabras clave:** análisis microbiológico, cultivo ecológico, verduras, fruta, viables aerobios mesófilos, coliformes, resistencia a antibióticos,  $\beta$ -lactámico, carbapenémicos, antibiograma, genes.

## Estudi de les resistències a antibiòtics carbapenèmics en mostres i aïllats de vegetals procedents de cultiu ecològic.

### Resum

Els bacteris resistents a antibiòtics (ARB) són una amenaça emergent per a la salut humana, animal i ambiental. La seua introducció en la cadena alimentària té conseqüències a nivell de 'One Health'. Dins d'aquests patògens, els Gram negatiu de resistència a carbapenemes són considerats per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) de crítica prioritat. Açò se deu al fet que els antibiòtics carbapenèmics representen actualment l'agent més actiu i potent contra patògens Gram negatius amb resistències a múltiples drogues (MDR) i no hi ha alternatives de tractament eficaç. A més, la incidència de dites patògens ha augmentat en l'últim segle i la seua infecció s'associa a una alta taxa de mortalitat.

La situació s'agreuja amb la tendència a l'alça del consum de vegetals orgànics i crus, que al no ser tractats ni cuinats poden ser un potencial reservori de vectors bacterians. En els últims cinc anys el creixement del gasto en productes ecològics a Espanya segons el Ministeri d'Agricultura i Pesca ha sigut del 67,42%

En este treball es van avaluar mostres d'espinaç, encisam, col llombarda, col arrissada i maduixes de cultius ecològics de diferents establiments minoristes de València, amb tal de determinar el seu paper en la transmissió de bacteris resistents a antibiòtics i els seus gens.

En primer lloc, es va analitzar la qualitat microbiològica de les mostres a través de recomptes de microorganismes clau en l'anàlisi higiènic sanitari (microorganismes viables aerobis mesòfils, coliformes totals i *Escherichia coli*). Els nivells trobats només van ser alarmants per a dos mostres, una d'encisam i una altra d'espinaç, en les quals es va superar els límits preestabeguts de *E. coli*.

A continuació, es van identificar els aïllats sospitosos de ser resistents a cefalosporines de tercera generació i carbapenems, antibiòtics de la família dels  $\beta$ -lactàmics. Després d'això, es van determinar els seus perfils de resistència a través del mètode d'antibiograma disc-placa, detectant-se aproximadament un 9 % de bacteris amb multiresistència.

Per a elucidar l'origen dels resistències, és va estudiar la presència de gens de resistència a carbapenems (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* i *bla<sub>VIM</sub>*) en les mostres i en els aïllats. Dos d'ells, és van detectar en les mostres procedents de TSB i tres en els ceps.

Els resultats manifesten el risc que comporta el consum en cru d'aquests aliments i la necessitat de llavar-los prèviament a la seua ingesta. També reflectixen l'*estatus quo* de la prevalença d'ARB i ARG i l'imperatiu d'establir mesures de supervisió epidemiològica i de disminució de consum d'antibiòtics.

**Paraules clau:** anàlisi microbiològic, cultiu ecològic, verdures, fruita, viables aerobis mesòfils, coliformes, resistència a antibiòtics,  $\beta$ -lactàmic, carbapenèmics, antibiograma, gens

# Study of the antibiotic resistances to carbapenems in samples and isolates from vegetables of ecologic harvests.

## Abstract

Antibiotic resistant bacteria (ARB) are an emerging threat to human, animal and environmental health. Its introduction into the food chain has consequences at the level of 'One Health'. Within these pathogens, the gram-negative ones with resistance to carbapenems are considered by the World Health Organization (WHO) to be of critical priority. This is because carbapenem antibiotics currently represent the most active and potent agents against gram-negative pathogens with multi-drug resistance (MDR) and there are no effective treatment alternatives. Furthermore, the incidence of these pathogens has increased in the last century and their infection is associated with a high mortality rate.

The situation is aggravated by the upward trend in the consumption of organic and raw vegetables, which, since they are not treated or cooked, can be a potential reservoir of bacterial vectors. In the last five years, according to the Ministry of Agriculture and Fisheries, the growth of expenditure on organic products in Spain has been 67,42%.

In this work, samples of spinach, lettuce, red cabbage, kale and strawberries from organic crops from different retail establishments in Valencia were evaluated, in order to determine their role in the transmission of antibiotic-resistant bacteria and their genes.

In the first place, a sanitary hygienic analysis took place through counts of key microorganisms (viable mesophilic aerobic microorganisms, total coliforms, and *Escherichia coli*) to establish the microbiological quality of the samples. The levels found were only alarming for two samples, one of lettuce and the other of spinach, in which the pre-established limits for *E. coli* were exceeded.

Isolates suspected of being resistant to third generation cephalosporins and carbapenems, antibiotics of the  $\beta$ -lactam family, were then identified. After that, their resistance profiles were determined through the disk-plate antibiogram method, detecting approximately 9% of bacteria with multi-resistance.

To elucidate the origin of the resistance, the presence of carbapenem resistance genes (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>VIM</sub>) in the samples and isolates was studied. Two of them were detected in the samples from TSB and three in the strains.

The results show the risk involved in raw consumption of these foods and the need to wash them before eating them. They also reflect the *status quo* of the prevalence of ARB and ARG and the imperative to establish epidemiological surveillance measures and to reduce the consumption of antibiotics.

**Key words:** *microbiological analysis, organic farming, vegetables, fruit, viable mesophilic aerobes, coliforms, antibiotic resistance,  $\beta$ -lactam, carbapenems, antibiogram, genes.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido posible gracias a mis tutoras María Ángeles y Ana, a mis compañeros de laboratorio Álvaro y Sara, y a Nancy y a Miguel. Me habéis enseñado con paciencia lo que es investigar, tener constancia y realizar un pequeño proyecto con el que he aprendido más allá de lo académico.

No hubiera llegado hasta aquí sin el apoyo incondicional de mis padres y mi hermana. Gracias por animarme a continuar y encontrarme.

Gracias también a mis amigos de toda la vida, que una etapa más, tengo la suerte de tenerlos a mi lado. Y gracias a aquellos que os habéis sumado y que definitivamente sois lo mejor que me llevo de estos años.

Finalmente, agradecerme a mí misma la ilusión y el querer ser.

# ÍNDICE

1	Introducción.....	1
1.1	Antibióticos y Resistencia a antibióticos .....	1
1.1.1	Mecanismos de acción de los antibióticos .....	3
	β-lactámicos.....	4
1.1.2	Mecanismos bacterianos de resistencia.....	4
1.2	Fuentes de propagación de las resistencias antimicrobianas .....	7
1.2.1	Fuente natural.....	7
1.2.2	Fuentes antropogénicas .....	8
1.3	Iniciativa <i>One Health</i> .....	10
1.4	Normativa y regulación europea.....	11
2	Objetivos.....	12
3	Materiales Y Métodos.....	13
3.1	Muestras De Vegetales Y Procesado .....	13
3.2	Estudio De La Calidad Higiénico-Sanitaria .....	14
3.2.1	Análisis estadístico de los recuentos.....	15
3.3	Aislamiento de microorganismos Gram negativos resistentes a antibióticos β-Lactámicos.....	15
3.3.1	Aislamiento de microorganismos resistentes a cefalosporinas de 3ª generación .....	15
3.3.2	Aislamiento de microorganismo con resistencia a carbapenemes .....	16
3.4	Identificación de los microorganismos aislados mediante pruebas bioquímicas .....	16
3.5	Estudio de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas.....	17
3.6	Determinación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos.....	18
3.6.1	Extracción de DNA.....	18
3.6.2	PCR multiplex .....	19
4	Resultados .....	21
4.1	Condiciones higiénico-sanitarias .....	21
4.2	Aislamiento e identificación bioquímica de cepas de interés .....	22
4.3	Perfil de resistencia antibiótica de los aislados .....	24
4.4	Estudio De La Detección De Genes De Resistencia Carbapenemes .....	27
5	Discusión.....	30
5.1	Calidad higiénico-sanitaria de las muestras de vegetales ecológicas.....	30
5.2	Identificación bioquímica de las cepas aisladas .....	31
5.3	Resistencia a antibióticos de los aislados.....	32
5.4	Detección de genes de resistencia a β-lactámicos .....	33
6	Conclusiones .....	35
7	Bibliografía.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.. Estructura genérica de cefalosporinas y carbapenémicos .....	4
Figura 2. Ilustración de la entrada de antibiótico $\beta$ -lactámico a través de los canales de porinas e interacción con las enzimas $\beta$ -lactamasas y/o con las PBPs. ....	6
Figura 3. Epidemiología de la resistencia antimicrobiana. ....	7
Figura 4 Apariencia de coliformes (rosa) y E. coli (azul) en medio CC .....	15
Figura 5. Tabla colorimétrica para la obtención de un perfil numérico de la tira API 20NE.....	17
Figura 6 Placas de las cepas 114M5 (izquierda) y 116SC5 (derecha) sembradas en medio Mueller-Hinton con discos de antibióticos post-incubación. ....	18
Figura 7. Medias e intervalos de confianza de los valores obtenidos en a) recuento de Viables mesófilos aerobios y b) recuentos de Coliformes; para los cinco tipos de vegetal estudiados..	21
Figura 8. Especies identificadas en el medio mSuperCARBA (SC) y MacConkey (MC). ....	23
Figura 9. Recopilación por antibióticos del perfil de resistencia de los aislados. ....	25
Figura 10. Susceptibilidad antimicrobiana de los diferentes productos (%). ....	26
Figura 11. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados por época del ensayo expresada en % de cepas. ....	27
Figura 12. Porcentaje de aislados invasivos con resistencia a carbapenemes (imipenem/meropenem), por país y área.....	31



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Causas principales del desarrollo en declive de la búsqueda de antibióticos. ....	1
Tabla 2. Principales ARB y sus correspondientes ARG para cefalosporinasas y carbapenemasas. .....	7
Tabla 3. Resumen combinado de los objetivos de planes de acción y estrategias de la WHO/FAO/OIE.....	11
Tabla 4. Recopilación de las muestras vegetales analizadas en el trabajo .....	13
Tabla 5. Antibióticos elegidos para estudiar la sensibilidad de los aislados. ....	18
Tabla 6. Secuencias de los primers para los genes de resistencia a carbapenemes <i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> , <i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> y tamaño esperado de sus respectivos amplicones. ....	19
Tabla 7. Condiciones empleadas en la PCR para los genes de resistencia a carbapenemes. ....	20
Tabla 8. Recuentos de los microorganismos analizados en las muestras.....	21
Tabla 9. Listado de las especies aisladas de vegetales crudos y fresa, incluyendo su número de aislados y nº de muestras de las que se obtuvieron. ....	23
Tabla 10. Perfiles de resistencia definitiva a antibióticos mostrados por las cepas aisladas. ....	24
Tabla 11. Genes detectados en las muestras procedentes de caldo TSB + MEM+VAN.....	28
Tabla 12. Genes detectados en los aislados identificados. ....	28
Tabla 13. Frecuencia de detección de los genes <i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> y <i>bla<sub>KPC</sub></i> en los aislados según tipo de producto.....	29

# 1 Introducción

Durante las últimas décadas, se ha dado paso a un periodo de descontrol infeccioso jamás experimentado con anterioridad. Cepas patógenas resistentes a la mayoría de los antibióticos en uso son detectadas y aisladas de manera rutinaria en los laboratorios. Al mismo tiempo, es escaso el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos. Todo ello ha llevado a los especialistas a anunciar que estamos en la era post-antibiótica.

## 1.1 Antibióticos Y Resistencia A Antibióticos

Un antibiótico es un fármaco natural, sintético o semisintético que a concentraciones bajas ejerce una acción hacia microorganismos sensibles (toxicidad selectiva). El primer antibiótico descubierto fue el Salvarsán o Arsfenamina, el cual constituyó el primer tratamiento efectivo para la sífilis y la tripanosomiasis humana africana. A continuación, la producción de antibióticos se vio impulsada por el descubrimiento de la penicilina por Fleming (1928) (Zumbado Morales et al., 2022). Finalmente, su desarrollo ha seguido una tendencia a la baja debido a una confluente multicausalidad (Tabla 1) que ha llevado el problema de la resistencia a los antibióticos a convertirse rápidamente en una crisis de salud mundial de interés público según organizaciones globales como la WHO (World Health Organization)(Michael et al., 2014).

*Tabla 1. Causas principales del desarrollo en declive de la búsqueda de antibióticos. Adaptada de (Capita & Alonso-Calleja, 2013)*

- |  |
|--|
| 1. Vida útil corta debido a la imposibilidad de evitar la emergencia de resistencia. Además, los antibióticos se testean a corto plazo y su efectividad se cierne a la capacidad de revertir la infección (5-14 días), no se efectúan pruebas a largo plazo. |
| 2. Globalización y mercado libre   |
| 3. Su creación es más compleja que la de otros fármacos, ya que su modo de acción puede diferir de una especie bacteriana a otra.  |
| 4. Menos rentabilidad que otras drogas que se consumen con mayor prevalencia (enfermedades crónicas (ej. diabetes) o condiciones que afectan gran parte de la población (ej. depresión).   |
| 5. Mercado de antibióticos amplio, fuerza a nuevos productos una alta competencia.   |

La creciente preocupación por el uso inadecuado de los antibióticos ha resultado en una disminución general en su consumo y por tanto un impacto negativo en su venta. Más específicamente, durante el periodo de 2014 a 2020 hubo una disminución del 23 % en el consumo total en la EU/EEA de 21,2 dosis diarias definidas (DDD) por 1000 habitantes a 16,4. (EFSA, 2022). Como resultado, el valor actual neto (VAN) de un proyecto de desarrollo de un antibiótico ronda los -50 millones \$, en comparación con los 1150 millones de los medicamentos músculoesqueléticos (Brogan & Mossialos, 2016). Es por ello, que las farmacéuticas optan por innovaciones alternativas más lucrativas.

La EFSA (European Food Safety Authority) define la resistencia antimicrobiana (AMR) como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie (EFSA, 2022). Su vigilancia figura como problema sanitario bajo la Decisión n.º 1082/2013/UE de la Comisión Europea del Parlamento Europeo y del Consejo, del 22 de octubre de 2013 sobre amenazas transfronterizas graves para la salud, y en la Decisión de

Ejecución de la Comisión (UE) 2018/945, del 22 de junio de 2018, sobre las enfermedades transmisibles y los problemas sanitarios especiales conexos que deben ser objeto de vigilancia epidemiológica.

La AMR aparece conjuntamente a un factor de estrés, que selecciona aquellas bacterias resistentes dentro de la población afectada. Bajo presión de selección, estas bacterias sobreviven y se multiplican generando progenie resistente. Después de un tiempo, la población sensible habrá sido reemplazada por la resistente. Los antibióticos se consideran factores de estrés, y, por tanto, su uso incorrecto como por ejemplo una dosis demasiado baja o un tratamiento de duración equivocada, tiene como consecuencia una mayor posibilidad de adaptación por parte de las bacterias diana (WHO, 2002). A esta presión selectiva se le ha de adicionar el uso de biocidas (ej. desinfectantes, descontaminantes, conservantes...) los cuáles actúan contra bacterias en ámbitos relacionados con la salud a lo largo de la cadena alimentaria (Cheng et al., 2019).

El contexto actual sitúa en la Unión Europea una prevalencia alta de resistencia en bacterias que causan infecciones graves en humanos y alcanza un 25% o más en varios estados miembros (ECDC, 2007;). Este marco es grave dado que los antibióticos siguen siendo la primera opción de prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas. Además de la emergencia de nuevas bacterias resistentes a antibióticos (ARB), su propagación es de especial interés. El intestino humano es rico en nutrientes y se encuentra a una temperatura adecuada y posee gran densidad bacteriana (microbiota), lo que lo convierte en un semillero ideal para el intercambio de genes resistentes a los antibióticos (ARG) entre estos microorganismos. Cuando las bacterias patógenas oportunistas que se encuentren en el intestino adquieren ARG de habitantes transitorios, las enfermedades infecciosas que causan se pueden volver más difíciles de tratar, o incluso imposibles de curar (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

En definitiva, esta amenaza a la salud presenta pronósticos preocupantes, como la próxima realidad que plantean algunos expertos sobre la ineficacia de las terapias con antibióticos en los próximos 100 años. Sin embargo, no hace falta poner el foco temporal tan lejos. A presente, la carga financiera, social y mortal es de gran índole, sobre todo en países en vías de desarrollo, debido al estado más precario de sus sistemas de salud, infraestructura e inestabilidad económica (Cars & Nordberg, 2005). Esto se traduce en que la población más vulnerable con sistemas inmunitarios debilitados, para los cuales una terapia adecuada es esencial para la supervivencia, sufran de abastecimientos irregulares y disponibilidad limitada de antibióticos. Además, la resistencia a los antibióticos impide la implantación de procedimientos médicos avanzados, como los trasplantes de órganos donde los antibióticos son cruciales para la seguridad del paciente y para evitar complicaciones (Cars & Nordberg, 2005).

Las ARB tienen como consecuencia una exacerbación y prolongación de la enfermedad y del tratamiento hospitalario, lo que conlleva a un coste a EU de aproximadamente 1,5 billones de euros por año en cuanto a gastos de salud y de pérdida de productividad (Comisión Europea, 2022). El precio tributable a una infección antimicrobiana resistente en un paciente hospitalizado se estima entre 18.325,82 y 28.658,98 € (EASAC, 2007; Roberts et al., 2009).

El impacto de la resistencia de antibióticos en términos de mortalidad y movilidad es difícil de cuantificar debido a que ésta se adiciona a la previa infección inicial. Sin embargo, está claro que los pacientes tienen más probabilidad de morir si la bacteria causante es resistente a los tratamientos antibióticos empleados, y si sobreviven, habrán requerido una terapia más costosa, y habrán estado enfermos más tiempo con más probabilidad de hospitalización. Se ha estimado que las infecciones debidas a bacterias multirresistentes (alrededor de 386.000 en 2007) resultan en más de 2,5 millones de días de hospitalización adicionales y causan 33 000 muertes cada año en la Unión Europea, Islandia y Noruega (Comisión Europea, 2022). Las infecciones por cepas resistentes a los antibióticos se asocian con una calidad de vida reducida, con infecciones bacterianas metastásicas, un aumento en las tasas de recurrencia, cronicidad y futuras infecciones oportunistas con organismos resistentes. Se pronostica que la cantidad de muertes por infecciones resistentes a los antibióticos mundialmente alcance los 10 millones anuales para 2050, situándose como la principal causa de muerte, con un costo acumulado que alcanzaría los \$100 billones si no se establecen medidas efectivas (*Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*, 2014). Análisis de la OECD afirman que invirtiendo 1,5 € per cápita por año en políticas de acción evitarían este porvenir (EFSA, 2022).

Por las razones expuestas, Europa ha lanzado un plan de acción bajo el enfoque de la WHO conocido como '*One Health*', donde se listan prioridades como la monitorización y evaluación de ARB, en la cual se enmarca el presente proyecto bajo los principios del plan nacional español.

### 1.1.1 Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antibióticos se pueden clasificar en cinco grupos principales de interés clínico según su mecanismo de acción y la función bacteriana intrínseca que afectan. Las categorías se describen a continuación en base a la información dada en el capítulo descrito por Calvo & Martínez-Martínez, 2009 en el tomo de *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

- Antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana. Actúan en distintas fases de la síntesis de la pared celular (citoplasmática, transporte, organización) comprometiendo la integridad de la estructura. Para ejercer su acción la bacteria debe de hallarse en crecimiento activo y en un medio isotónico o hipotónico. Ejemplos incluyen la fosfomicina y la cicloserina.
- Agentes que alteran las propiedades de la membrana citoplasmática. Actúan como bactericidas, incluso en bacterias en reposo modificando la permeabilidad de la membrana y provocando la salida de iones de potasio, esenciales para la supervivencia bacteriana. A este grupo pertenecen las polimixinas y la gramicidina.
- Agentes que inhiben la síntesis proteica en alguna de sus fases (activación, inicio, fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma, elongación). Interfieren en las subunidades ribosómicas, la mayoría actúan como bacteriostáticos, con la excepción de los aminoglucósidos que se comportan como bactericidas.
- Agentes que actúan sobre la estructura de ácidos nucleicos. Este grupo de antibióticos impiden la función de algunos de los componentes responsables de la síntesis de ácidos nucleicos. Las quinolonas inhiben la función de las topoisomerasas II y IV que desenrollan y superenrollan el ADN. La rifampicina es responsable de la inhibición de la ARN polimerasa

porque bloquea la subunidad beta de la ARN polimerasa ADN-dependiente, de esta forma se evita el proceso de transcripción.

- Sustancias conocidas como antimetabolitos. Intervienen en la obtención bacteriana de ácido fólico. Este es necesario para producción de aminoácidos y bases de nucleótidos. Dentro de este grupo encontramos a las sulfonamidas y trimetoprima.

#### a. $\beta$ -lactámicos.

El presente trabajo se centra en los antibióticos de tipo carbapenémico y cefalosporinas porque son a menudo, fármacos de último recurso que se utilizan para tratar infecciones multirresistentes (van Duin & Doi, 2017, Iovleva & Doi, 2017). Pertenecen a la familia de los  $\beta$ -lactámicos ya que contienen un anillo  $\beta$ -lactámico (anillo de azetidionona de cuatro miembros) en su estructura molecular (Fig.1). Esta es la clase de antibióticos más utilizada debido a su probada eficacia, seguridad y espectro de actividad, casi dos tercios de las prescripciones hospitalarias actuales incluyen estos agentes (Bush & Bradford, 2016).

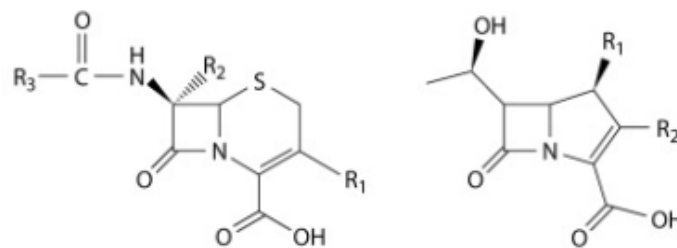


Figura 1.. Estructura genérica de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas (izquierda) y carbapenémicos (derecha). Basada en (Bush & Bradford, 2020)

Los  $\beta$ -lactámicos actúan como un inhibidor irreversible de la enzima transpeptidasa, una enzima utilizada por las bacterias para fabricar sus paredes celulares. El paso final de la transpeptidación en la síntesis del peptidoglucano es facilitado por transpeptidasas conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBPs). Las PBP se unen al D-Ala-D-Ala al final de los muropéptidos, los precursores de peptidoglucano, para entrecruzarlo antes de que pueda tener lugar la división celular. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos imitan el sitio de unión a las PBPs, y de esta forma, inhiben competitivamente el entrecruzamiento del peptidoglucano actuando como sustrato subrogado. A nivel molecular, estos antibióticos se unen a la Serina del sitio activo de las PBPs y la acetilan en una reacción irreversible (Dowling et al., 2017). La afinidad con la que se unen depende del tipo de  $\beta$ -lactámico. La inhibición del entrecruzamiento ocasionado por los  $\beta$ -lactámicos provoca la acumulación de precursores de la pared celular, lo que desencadena la digestión de los peptidoglicanos existentes mediante hidrolasas autolíticas. Esta reacción de digestión junto con la acción de los antibióticos incrementa la acción bactericida de los  $\beta$ -lactámicos, hasta que finalmente la integridad estructural de la pared celular se ve seriamente comprometida y se produce la lisis celular (Nordmann et al., 2012).

#### 1.1.2 Mecanismos bacterianos de resistencia

La resistencia a antibióticos puede ser innata (intrínseca), es decir que tiene relación con la anatomía y fisiología del microorganismo. Esta incluye características propias que confieren una ventaja al microorganismo que las posee, ejemplos son: la ausencia de la diana del agente

antimicrobiano, escasa permeabilidad de la envoltura celular, producción de enzimas que inactivan el antimicrobiano o presencia de sistemas de eflujo que disminuyen la concentración intracelular de antibiótico (canales de porina, bombas de flujo). La resistencia intrínseca es un rasgo inherente en ciertas especies bacterianas (denominadas "insensibles" o "no susceptibles") y no se ve afectada por el uso (o mal uso) de antibióticos. Por ejemplo, la membrana externa de las bacterias Gramnegativas las hace relativamente impermeables a los compuestos hidrófobos como los antibióticos macrólidos, lo que les confiere una resistencia intrínseca a estos fármacos (Capita & Alonso-Calleja, 2013). Estas ARB se pueden considerar nativas, omnipresentes en el medio ambiente previa a una influencia antropogénica.

La gran mayoría de los organismos resistentes a antibióticos han surgido como resultado de un estrés. Han sido seleccionados de las comunidades nativas, ya que han desarrollado estrategias temporales de variación genética como mutaciones, recombinaciones, transposiciones o patrones de expresión alternativos que recaen en la evolución vertical, o bien, por intercambio de genes bajo transferencia horizontal entre cepas. Estos ajustes dan lugar a un gran abanico de posibles formas biológicas de resistencia adquirida que caracterizan cada cepa (Rodrigo et al., 2007).

Dentro de la **transferencia horizontal de genes (HGT)** encontramos diversos mecanismos como son la conjugación por plásmidos, la transducción por bacteriófagos y la transformación por DNA extracelular. Estos mecanismos pueden ocurrir entre cepas de la misma especie de manera más favorecida, o entre diferentes especies o géneros bacterianos dentro de un mismo nicho ecológico que a su vez pueden ser patogénicos o no. Esta resistencia es la más preocupante ya que permite una alta diversificación del genoma y crea potencial para una mayor adaptabilidad. De hecho, la HGT puede ser más rápida que las mutaciones espontáneas a la hora de proveer genes de supervivencia (Charpentier et al., 2012). También se ha asociado la HGT a otros determinantes genéticos eficientes como genes de virulencia y de capacidad de formación de biopelículas ya que se han observado localizados conjuntamente en elementos genéticos móviles (Doyle & Erickson, 2006). Esta hipótesis se ha visto reforzada por la determinación de una mayor resistencia a biocidas y antibióticos por parte de las células bacterianas en comparación con las planctónicas. Esto se puede deber a que en estos consorcios bacterianos hay un extenso contacto entre células y una alta actividad metabólica.

La estrategia más común y eficiente de la HGT es la conjugación, en esta, plásmidos se transfieren físicamente a través del 'pilus' de las bacterias adyacentes en ambientes como la microbiota (conectividad ecológica), dejando una copia atrás, multiplicando la resistencia entre generaciones en el seno de una colonia bacteriana (Alanis, 2005). A menudo, los plásmidos llevan integrones (genes en conjunto casete controlados por el mismo promotor), que no se pueden mover por sí mismos, pero que codifican mecanismos para genes de resistencia y genes con la función de corte que les permite integrarse tras la conjugación en el cromosoma receptor. Esta colocación implica una coselección. Es una estrategia evolutiva responsable de la transferencia de ARGs desde las especies ancestrales.

La adquisición de diferentes genes de resistencia (ARGs) proporciona un relativo coste en competitividad para la célula huésped. La magnitud del coste biológico determina la estabilidad y el potencial de revertir la resistencia. Sin embargo, las bacterias han evolucionado hasta

alcanzar una misma resistencia sin coste biológico, mutando adicionalmente para equilibrar dicho coste (mutaciones compensatorias) o regulando de manera precisa la expresión. Esta evolución resistente ha permitido a las bacterias persistir en ausencia de presión de selección (Kempf & Zeitouni, 2012).

#### a. Mecanismo de resistencia frente a $\beta$ -lactámicos

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas propias de las bacterias que inhiben la acción de los  $\beta$ -lactámicos mediante la formación de un complejo reversible. Compiten con las PBPs para la unión con el antibiótico, interceptándolo así en el espacio periplásmico (Fig.2). (Bush & Bradford, 2020)

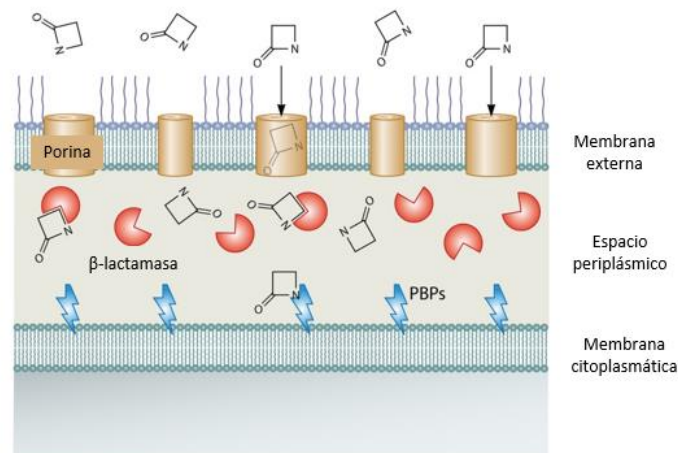


Figura 2. Ilustración de la entrada de antibiótico  $\beta$ -lactámico a través de los canales de porinas e interacción con las enzimas  $\beta$ -lactamasas y/o con las PBPs. Basada en (Bush & Bradford, 2020).

Tanto si se une el antibiótico a una PBP como a una  $\beta$ -lactamasa, se forma un reactivo intermediario estable que se puede hidrolizar con la adición de una molécula de agua (Fig. 3). La hidrólisis es rápida en el caso de la unión con la enzima, con una vida media de fracción de segundo, se obtiene la enzima y el antibiótico microbiológicamente inactivo. Sin embargo, la hidrólisis es lenta en el caso de la conjugación del antibiótico con la PBP, el complejo permanece catalíticamente no funcional en un periodo de tiempo suficientemente largo como para facilitar la muerte celular bacteriana.

Estas enzimas de resistencia están codificadas en plásmidos que son transferibles a través de diferentes especies tal y como se ha comentado más arriba. Las familias más prominentes son las cefalosporinasas y carbapenemasas que ahora aparecen globalmente, con preferencias geográficas para variantes específicas (Bush & Bradford, 2020). Las ARB y sus correspondientes genes codificadores para  $\beta$ -lactamasas quedan recogidos en la Tabla 2.

Los dos esquemas de clasificación más utilizados son la categorización molecular Ambler que separa las  $\beta$ -lactamasas en clases moleculares distintas (A, B, C y D) en base a su secuencia aminoacídica y la clasificación funcional Bush–Jacoby–Medeiros, que las distingue según que sustrato hidrolizan y como responden a varios inhibidores (Bush & Bradford, 2019).

Tabla 2. Principales ARB y sus correspondientes ARG para cefalosporinas y carbapenemasas.

Antibióticos	Resistencias	ARG	ARB	Referencia
Cefalosporinas	Cefalosporinas Clase C	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	<i>E. coli</i> ( <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> ) <i>K. pneumoniae</i> ( <i>bla</i> <sub>AmpC</sub> )	van Duijkeren et al. (2018)
Carbapenemes	Carbapenemasas: Clase A  Clase B (metalo-β-lactamasas)  Clase D (Oxicilinasas)	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>IMI-2</sub> , <i>bla</i> <sub>GES</sub>  <i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>  <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>K. pneumoniae</i> ( <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> ) <i>K. oxytoca</i> ( <i>bla</i> <sub>VIM</sub> )  <i>K. pneumoniae</i> ST15 ( <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> )  <i>K. oxytoca</i> ( <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> )	Ríos et al (2017)

## 1.2 Fuentes De Propagación De Las Resistencias Antimicrobianas

En el mundo globalizado que habitamos no hay fronteras para las bacterias. Estas se propagan a través de organismos vivos o inertes, en viajes, negocios, etc. Por tanto, el alcance de la emergencia de la aparición de resistencias a antibióticos es de prioridad. Esta interconectividad queda probada por Alegbeleye et al. (2018) dónde se recopilan los brotes de enfermedades con origen alimentario (1997 – 2017) y los patógenos presentes en diversas aguas, en el estiércol y en el suelo que pueden ser transmitidos a los cultivos y los cuales pueden ser portadores de resistencias.

A continuación, revisamos las distintas fuentes de propagación de resistencias adquiridas por las bacterias a los antibióticos.

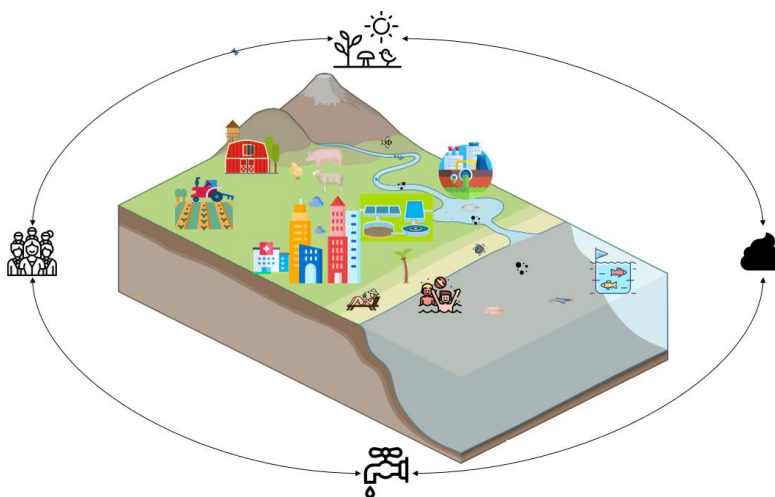


Figura 3. Epidemiología de la resistencia antimicrobiana. Interconexión circular entre la salud humana, animal y medioambiental tanto directa como indirecta (Elaboración propia).

### 1.2.1 Fuente natural

La fuente natural se refiere a aquellas bacterias resistentes encontradas que no han aparecido por contaminación antropológica, sino que se han originado de manera natural por mera competición evolutiva. Se han hallado cepas resistentes en lugares aislados del exterior que datan de hace 4 millones de años y que son resistentes a 14 antibióticos usados hoy en día en



clínica. Una gran cantidad de bacterias ambientales filogenéticamente diversas utilizan antibióticos como única fuente de carbono, convirtiéndose así en reservorio de genes de resistencia que pueden ser transferidos a patógenas y diseminadas (Alós, 2015). Por tanto, con anterioridad a la intervención humana, existe un resistoma basal que, se define como la colección global de todos los genes de resistencia microbiana (Brown & Wright, 2016). El hecho de que todas las clases de antibióticos aprobadas hasta el momento hayan mostrado resistencias en los patógenos a los que se dirigen da a entender que el ambiente siempre va a encontrar mecanismos con los que contrarrestar los nuevos antibióticos con resistencias a menos de que se cambie radicalmente el diseño de estos fármacos (Larsson & Flach, 2022).

### 1.2.2 Fuentes antropogénicas

A pesar de que la producción natural de moléculas antibióticas contribuyó con la evolución primaria de los ARGs, no es responsable de la reciente expansión de los mismos entre distintas especies y entre distintos ambientes. Esta emergencia se atribuye a los antibióticos producidos por los humanos como agentes terapéuticos ya que actúan a gran escala y por tanto están expuestos a presiones de selección a lo largo de extensas comunidades microbianas (Larsson & Flach, 2022). Los antibióticos se utilizan en diferentes ámbitos que se discuten a continuación, al igual que la contaminación resultante de su uso.

#### a. Ámbito sanitario

Sector originario del uso de antibióticos y fuente que mayormente ha contribuido a la extensión de problema de las resistencias. Hoy en día, los pacientes la mayoría de las veces toman una dosis mayor a la indicada, esto favorece la aparición de mutaciones espontáneas en las ARB ya que acompañan el aumento de la presión de selección (Zhang et al., 2022). Se infiere pues que existe una relación lineal entre el consumo de antibióticos y la resistencia bacteriana a estos.

En lugares productores y administradores de antibióticos como hospitales, tienen lugar contaminaciones con ARB, sobre todo con  $\beta$ -lactámicos y vancomicina. Las razones causantes pueden ser falta de higiene, desinfección incompleta, uso cruzado de equipos médicos o compartir salas con diferentes pacientes, etc. Las prescripciones que son extendidas en estos lugares son menores que en la comunidad (atención primaria, más tasa de impropiedad), sin embargo, el uso es más prolongado y de mayor volumen en menor población, por lo que se ejerce una mayor presión de selección. Se ha estimado que, en un día cualquiera, un promedio del 35 % de los pacientes hospitalizados en los países de la UE reciben al menos un antibiótico (rango de país 21-55 %) (Anderson et al., 2019)

#### b. Actividad ganadera

Globalmente, los antibióticos se utilizan en el sector ganadero con varios fines: promoción del crecimiento, prevención de enfermedades (profilaxis) y tratamiento de estas. El más problemático es el usar los agentes terapéuticos para alcanzar el peso de mercado necesario más rápidamente, ya que al utilizarse en cantidades inferiores a las indicadas lleva a que se desarrollen bacterias resistentes durante la matanza y el procesado del producto cárnico (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

Actualmente, hay leyes que regulan la administración de antibióticos en granjas. Primeramente, en 2006 se prohibió el uso de antibióticos para la promoción del crecimiento animal (Reglamento 1831/2003/EC7). Más adelante, el Reglamento (UE) 2016/429 de Sanidad Animal estableció las responsabilidades del operador y profesionales sanitarios en materia de prevención de resistencias a través de la bioseguridad en su explotación. Además, en España, el plan nacional de resistencia antimicrobiana (PRAN) decreta la directiva 2003/99/CE sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos que tiene como finalidad limitar las prescripciones según las necesidades y el impacto que estas pueden llegar a tener.

Estas políticas de regulación han tenido como resultado una disminución en la venta de antibióticos para la ganadería, que disminuyó en un 43% entre 2011 y 2020 en 25 países de la EU/EEA que reportan datos consistentemente (EFSA, 2022). El menor uso de estos antimicrobianos con el tiempo en el ámbito animal no ha comprometido la bioseguridad europea. Ya que la zoonosis derivada no ha aumentado. De hecho, en 2020 por la COVID19, se alcanzó un mínimo de consumo, y como resultado se observaron las menores cifras de brotes de enfermedades alimentarias en granjas, zoonosis, hospitalizaciones y muertes humanas derivadas (EFSA, panel brotes enfermedades transmitidas por alimentos).

#### c. Actividad agrícola

En las plantaciones, las ARB pueden aparecer tanto por el agua de riego contaminada como por el abono de estiércol procedente de animales previamente tratados con antibióticos que puede llegar a no estar tratado. Si bien los antibióticos empleados en la ganadería no suelen ser los mismos que se prescriben para el tratamiento de infecciones en humanos, muchos comparten el mecanismo de acción o pertenecen a la misma clase de antibióticos, pudiendo provocar la aparición de mecanismos de resistencia que afecten a los de uso clínico (Manyi-Loh et al., 2018). En estos casos la microbiota del suelo selecciona los genes de resistencia, lo que conlleva una disrupción del ciclo de nutrientes y del resto de organismos de la comunidad conectada a la cadena alimentaria en cuestión. En estudios de microcosmo se han observado que antibióticos en la tierra conllevan a una alteración de la biomasa microbiana, una afección de la estructura de la comunidad, y una modificación de los criterios de funcionalidad de esta, como la respiración inducida por sustrato, la reducción de hierro, amonificación, mineralización del nitrógeno y nitrificación (Cycoń et al., 2019).

#### i Agricultura ecológica

Son productos ecológicos aquellos que llevan impreso el logotipo de la UE y el código numérico de la entidad de control de quien depende el operador responsable. La elaboración se encuentra regulada bajo los requisitos del Reglamento 834/2007.

España ocupa el primer lugar en superficie de agricultura ecológica de la UE (ha) y está entre los tres primeros del mundo. La Comunidad Valenciana es la cuarta comunidad autónoma (2020) dentro del panorama nacional. Tanto la producción, como la consumición, gasto y exportaciones nacionales se asemejan por su tendencia al alza. En los últimos cinco años el crecimiento del gasto en productos ecológicos en España según el Ministerio de Agricultura y Pesca ha sido del 67,42%. Los principales productos comprados son las frutas (15,5%) y las hortalizas (13,9%). Categorías en las que se encuentran los productos alimentarios analizados en este trabajo.

Esta orientación se apoya en la búsqueda actual de una dieta sana que incluya verduras y frutas frescas orgánicas. Sin embargo, los vegetales están siendo cada vez más reconocidos como potenciales contenedores de vectores bacterianos generadores de enfermedades alimentarias. Además, las verduras que se cultivan cerca del suelo se suelen consumir crudas, exponiendo a los consumidores a un riesgo mayor de infección (Ruiz-Roldán et al., 2021) . Por tanto, el planteamiento del consumo de vegetales no tratados ni cocinados expondría mayormente el intestino del consumidor a las emergentes ARBs.

#### d. Sistemas acuáticos

La contaminación por ARBs llega al agua principalmente por las heces humanas y de animales. Las plantas depuradoras de aguas residuales suponen una gran contribución de ARB al ambiente, ya que no pueden eliminar las bacterias en su totalidad. Es por ello, que, tras el tratamiento, las ARB pueden permanecer en el medio acuático por un periodo extenso de tiempo, ejerciendo presión selectiva y propagándose a organismos habitantes del océano y ríos e incluso llegando a plantas de acuicultura, acumulándose así resistencias en la cadena alimentaria (Li et al., 2022).

Por ejemplo, el gen de resistencia que codifica para la carbapenamasa KPC se ha identificado en muestras de agua de grifo de Ohio, Estados Unidos. Muestras de una comunidad de Naciones Unidas en Canadá también aislaron OXA y VIM en su agua tratada de la red que guardaban en cisternas (Mills & Lee, 2019).

Se ha comprobado que el guardar en casa agua de lluvia o tratada lleva a su contaminación por cepas resistentes ya que hay altas probabilidades de la generación de sedimento y por tanto una alta acumulación. Esta realidad, supone un reto en países en vías de desarrollo. En ciudades de alta densidad se han encontrado bacterias con multi-resistencias en las aguas marinas y sedimentos próximos a deshechos de industrias, municipales y de acuicultura (Calero-Cáceres et al., 2017; Niestępski et al., 2019; Osińska et al., 2020).

### 1.3 Iniciativa *One Health*

La iniciativa *One Health* describe un principio que reconoce que la salud humana y animal están interconectadas y que las enfermedades se transmiten bidireccionalmente y por tanto se tienen que abordar desde ambos extremos simultáneamente. Este enfoque también abarca el medio ambiente y su vínculo con los microorganismos y organismos superiores. Este término se reconoce globalmente y ha sido ampliamente usado en EU y en la declaración sobre las AMR de 2016 de las Naciones Unidas (Comisión Europea, 2018) .

Desde una perspectiva de *One Health* se plantea la colaboración multidisciplinaria y la cooperación cercana entre personal sanitario, trabajadores de ganadería y agricultura para poder solucionar la crisis emergente de ARB. Así pues, la resiliencia consistiría en la capacidad de la sociedad humana y sus subcomponentes de proveer una respuesta rápida y efectiva para garantizar la seguridad alimentaria y del medio ambiente (Léger et al., 2021).

## 1.4 Normativa y Regulación Europea

El Plan Global de Acción sobre la Resistencia Antimicrobiana del 2015 estableció que los países decretaran, antes del 2017, planes nacionales (PRAN). Las principales vías de acción que se deben de abarcar en el PRAN para considerarse eficaz quedan recogidas en la Tabla 3.

*Tabla 3. Resumen combinado de los objetivos de planes de acción y estrategias de la WHO/FAO/OIE. Basada en (Anderson et al, 2019).*

1.	Aumentar la concienciación y educación sobre AMR. Iniciativas como el Día Europeo de la Concienciación de Antibióticos (EAAD).
2.	Fortalecer la vigilancia y el seguimiento, y avanzar hacia sistemas nacionales de vigilancia de “One Health”. Recolección de datos para la redacción de medidas.
3.	Fortalecimiento de la administración de antimicrobianos en la salud humana. Optimizar la prescripción de antibióticos, incluyendo su dosis y duración, teniendo en cuenta el éxito del tratamiento y la mínima toxicidad al medio y al paciente.
4.	Fortalecimiento de la prevención y control de infecciones (PCI) en salud humana en hospitales.
5.	Fortalecimiento de la PCI y reducción del uso inapropiado de antibióticos en animales.
6.	Limitar la exposición de patógenos resistentes a los antimicrobianos al medio ambiente.
7.	Fomentar la I+D de nuevas terapias antimicrobianas, diagnósticos y vacunas.

La acción europea se coordina en la Unión a través de programas como la Red de Vigilancia de Resistencia (EARS-Net) y de forma transcomunitaria con la red de Vigilancia de la Resistencia a Antimicrobianos de Asia Central y Europa (CAESAR). Con estas colaboraciones y usando metodologías compatibles se pretende complementar la información y tener una perspectiva paneuropea de la situación de la AMR (ECDC & WHO, 2022)

## 2 Objetivos

El objetivo de este proyecto es establecer la calidad microbiológica de las verduras y fresas de distintivo ecológico compradas en la ciudad de Valencia, España. Además, se pretende evaluar su papel como vehículo de bacterias que contengan genes de resistencia a antibióticos con potencial transmisión interespecie, mediante métodos de análisis bioquímico y génico molecular. Por lo tanto, se plantean los siguientes objetivos secundarios:

1. Estudiar el estado higiénico-sanitario de las muestras a través de recuentos de microorganismos indicadores (viables mesófilos aerobios, coliformes y *Escherichia coli*).
2. Aislar de modo dirigido bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación.
3. Establecer el perfil de resistencia antibiótica de los aislados, mediante antibiogramas, s a frente a 6 familias de antibióticos:  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, anfenicoles y sulfonamidas.
4. Detección de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) a carbapenemes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*) en las muestras con diferentes tratamientos (caldo con APT, con APT+VAN+CTX, TSB+VAN+MER) y de las cepas aisladas procedentes de estos.

### 3 Materiales Y Métodos

#### 3.1 Muestras De Vegetales Y Procesado

Entre junio del 2021 y mayo del 2022, 5 tipos de vegetales frescos con el distintivo ecológico europeo se compraron semanalmente en 11 supermercados y mercados populares de la ciudad de Valencia, España. Un total de 28 muestras se colectaron para análisis que incluían espinaca (*Spinacia oleracea*,  $n = 4$ ), lechuga romana (*Lactuca sativa*,  $n = 3$ ), col rizada (*Brassica oleracea* var. *sabellica*,  $n = 8$ ), col lombarda (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*,  $n = 8$ ) y fresa (*Fragaria*,  $n = 5$ ), estas se recogen en la Tabla 4. Para cada vegetal se utilizaron tres o cuatro unidades mientras que para las fresas se analizaron 750 g.

Tabla 4. Recopilación de las muestras vegetales analizadas en el trabajo. La identidad de los establecimientos de compra queda protegida bajo leyenda en código.

Vegetal	Muestras	Fecha del análisis
Espinaca	EF49	07/06/2021
	EF69	22/11/2021
	EF75	13/12/2021
	EF86	7/02/2022
Lechuga romana	EF54	21/06/2021
	EF81	24/01/2022
	EF89	14/02/2022
Col rizada	EF70	22/11/2021
	EF73	29/11/2021
	EF77	10/01/2022
	EF90	14/02/2022
	EF100	28/03/2022
	EF106	02/05/2022
	EF112	16/05/2022
	EF115	23/05/2022
Col lombarda	EF74	29/11/2021
	EF76	13/12/2021
	EF78	10/01/2022
	EF84	31/01/2022
	EF95	28/02/2022
	EF101	28/03/2022
	EF113	16/05/2022
	EF116	23/05/2022
Fresa	EF80	24/01/2022
	EF85	31/01/2022
	EF107	02/05/2022
	EF111	16/05/2022
	EF114	23/05/2022

Tras la llegada de los vegetales al laboratorio, estos se manipularon únicamente en la cabina de flujo laminar en condiciones de asepsia. La preparación de las muestras de las coles, lechuga y espinaca comenzó con el descarte de sus hojas más externas y el corte del resto con unas tijeras estériles en porciones más pequeñas. Los fragmentos resultantes se mezclaron para

homogeneizar. A diferencia del resto de vegetales, las fresas se procesaron únicamente cortando el sépalo y el pedículo, dejando únicamente el fruto consumible.

### 3.2 Estudio De La Calidad Higiénico-Sanitaria

Para analizar la carga microbiológica de partida, se tomaron 25 g de cada muestra disponiéndolos en una bolsa aséptica con filtro lateral. Se le adicionaron 225 mL de agua de peptona tamponada estéril (APT, Scharlau, Barcelona) obteniendo una dilución 1:10 de la muestra. Se utilizó este medio porque es no selectivo y recomendado para el enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos de importancia sanitaria. Seguidamente, las muestras de vegetales se homogeneizaron en el Stomacher (BAGPAGE, Interscience, BagSystem) durante 4 minutos, excepto las de fresas que se homogenizaron de forma manual, ya que se quisieron evitar posibles obstrucciones en el futuro paso de extracción del ADN. A partir de esta misma dilución, 50 mL se tomaron en tubo Falcon y se congeló a -20 °C hasta una posterior extracción de ADN e identificación de genes de resistencia a antibióticos.

A partir de cada bolsa se realizaron diluciones seriadas decimales en agua destilada estéril, con las que se llevaron a cabo los recuentos de microorganismos viables aerobios mesófilos y microorganismos coliformes cuyos procedimientos se explican seguidamente. Los conteos se realizaron por duplicado y para placas con un número de colonias mayor a 30.

#### Recuento de viables mesófilos aerobios

Siguiendo la norma ISO 4833-1:2013, para los vegetales se inoculó 1 mL de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  y para las fresas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en placas estériles, en las cuáles se vertió medio de cultivo Plate Count Agar (PCA, Scharlau, Barcelona) y se mezcló de manera cuidadosa, aplicando la técnica de siembra en profundidad. Se dejaron incubando a  $28 \pm 1$  °C durante  $48 \pm 1$  h. Cada dilución se sembró por duplicado.

La lectura del recuento de viables, tras la incubación, se efectuó bajo la directiva de la Norma ISO 7218 que regula el procedimiento de los exámenes microbiológicos de alimentos para el consumo humano y animal. Consiste en contar las colonias de las placas por dilución, cuyo número esté entre 30 y 300 colonias y calcular las Unidades Formadoras de Colonias por gramo (U.F.C./g) empleando la Ecuación 1. Donde  $p1$  y  $p2$  corresponden a las colonias contadas por muestra y  $d$  a la dilución escogida. Para facilitar el conteo se utilizó el aparato digital Colony Counter (Digital S, P Selecta).

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

Ecuación 1

#### Recuento de coliformes y *E.coli*

El recuento de coliformes y *E. coli* se basa en el descrito por la norma UNE-EN ISO 9308-1:2014 para la detección de *E. coli* y bacterias coliformes en el agua. Por ello, para cada muestra se inoculó 0,1 mL de las diluciones  $10^{-1}$  a la  $10^{-3}$  sobre la superficie de placas con medio cromógeno

(CC, Chromogenic Coliforms Agar Base, Scharlau, Microinstant®, Barcelona) el cual nos permite seleccionar y distinguir *E. coli* del resto de coliformes. Se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 1$  h.

El computo de la carga microbiana de bacterias coliformes y *E. coli* se realizó de manera similar al de viables, a diferencia que la fórmula aplicada tiene un multiplicador adicional de 10, ya que la cantidad de muestra inoculada es 10 veces menor que en el recuento de viables. El medio CC es selectivo y permite la distinción visual de colonias, ya que contiene sustratos cromógenos Salmon-GAL (6-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y X-glucurónido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucurónido), que son procesados por los dos tipos de bacterias resultando en coloración distintiva. Las bacterias coliformes presentan el enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, que escinde Salmon-GAL produciendo colonias rosas. *E. coli*, además de contener este enzima, también presenta el enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa, que escinde X-glucurónido, produciendo colonias azules (Fig.4).

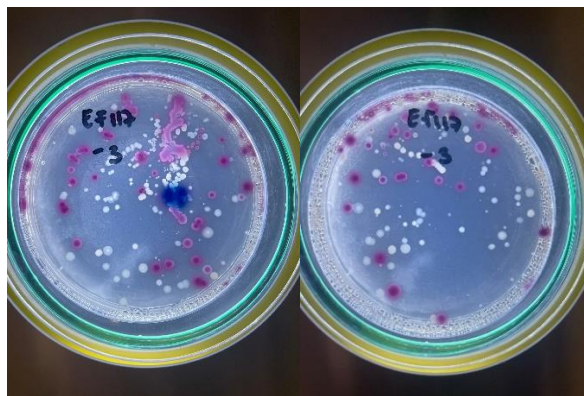


Figura 4 Apariencia de coliformes (rosa) y *E. coli* (azul) en medio CC

### 3.2.1 Análisis estadístico de los recuentos

Para comparar los resultados de los recuentos de microorganismos en las diferentes muestras de vegetales, se realizó un análisis de varianza simple con el programa STATGRAPHICS Centurion XVIII (<https://statgraphics.net/>). A posteriori, se empleó el método de la mínima diferencia significativa (LSD) en la prueba *post-hoc* de Rangos múltiples.

## 3.3 Aislamiento De Microorganismos Gram Negativos Resistentes A Antibióticos B-Lactámicos

El aislamiento de bacterias se centró hacia las bacterias Gram negativas, ya que este tipo poseen una membrana externa que les confiere resistencia natural a un gran espectro de antibióticos.

### 3.3.1 Aislamiento de microorganismos resistentes a cefalosporinas de 3ª generación

Con el fin de seleccionar microorganismos resistentes a cefalosporinas de 3ª generación se prepararon recipientes con 90 mL de APT suplementada con los antibióticos cefotaxima (CTX) (2,5 mg/L) y vancomicina (VAN) (5 mg/L); este último con el fin de inhibir a las bacterias Gram positivas (Liu et al., 2018).



Se tomaron 10 g de muestra de vegetal y se homogenizó con el APT en bolsa aséptica. Tras la incubación a 37 °C durante 24h, se sembró mediante triple estría en agar MacConkey (MCA) (MacCONKEY AGAR, Scharlau, Microinstant, Barcelona) suplementado con los mismos antibióticos a igual concentración. Estas placas se incubaron de la misma forma. Por cada muestra, se seleccionaron, de forma aleatoria, 5 colonias crecidas en agar MacConkey de diferente aspecto, sembrándose por triple estría en PCA (37 ± 1 °C, 24 h) resembrando tantas veces fuera necesario hasta la obtención de cultivos puros.

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

### 3.3.2 Aislamiento de microorganismos con resistencia a carbapenemes

De manera paralela, con el fin de enriquecer y aislar microorganismos con resistencia a carbapenemes, se tomaron otros 10 g de muestra dispuestos en una bolsa aséptica a la que se añadieron 90 mL de caldo de Triptona y Soja (TSB), suplementado con los antibióticos meropenem (MEM) (1mg/L) y de vancomicina (8 mg/L).

De nuevo, tras la incubación del caldo (37 °C, 24 h), se sembraron por triple estría en placas con medio mSuperCARBA(SC, CHROMagar™). Este se empleó porque es altamente selectivo y específico para bacterias con resistencias a carbapenemes, ya que inhibe en gran medida el crecimiento de aquellas con enzimas ESBL (β-lactamasas de amplio espectro) y AmpC. Además, permite diferenciar las colonias de *E. coli*, con una coloración rosa oscuro o rojo, colonias de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* por su color azul metálico, las de *Pseudomonas* por color crema translúcido a azul y las de *Acinetobacter* por un color crema opaco. Por tanto, repitiendo el proceso descrito en el apartado anterior, por cada muestra se seleccionaron 5 colonias de diferente color con tal de obtener representación de todas las familias, las cuales que se resembraron en PCA (37 ± 1 °C, 24 h).

## 3.4 Identificación De Los Microorganismos Aislados Mediante Pruebas Bioquímicas

Tras obtener cultivos puros en PCA de bacterias procedentes de los caldos diferencialmente enriquecidos, se procedió a realizar ensayos para su identificación.

En primer lugar, se llevaron a cabo las pruebas base. Se quisieron seleccionar aquellas bacterias aerobias o anaerobias facultativas y para ello se llevó a cabo la **prueba de catalasa**. Esta consiste en depositar una colonia aislada sobre una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si se observan burbujas durante el primer minuto significa que la cepa es poseedora de la enzima catalasa y puede descomponer el peróxido de hidrógeno en los subproductos de oxígeno y agua.

La siguiente característica diana fue la posesión del sistema **citocromo-oxidasa**. Por cada muestra, se aplicó a una colonia aislada una tira reactiva de oxidasa (OXIDASE Reagent, Scharlau, Barcelona, Spain).

Finalmente, la última propiedad buscada, fue la de ser Gram negativo, para lo cual, se realizó una tinción Gram.

En resumen, aquellas cepas aisladas en cultivo puro fresco (PCA) de una muestra vegetal, que demostraron en las pruebas previas, que eran catalasa y oxidasa positivas y Gram negativo, pasaron a ser identificadas bioquímicamente con la tira de pruebas bioquímicas miniaturizada API NE 20 (Biomèrieux) siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 5). Se introdujeron los resultados obtenidos de las 20 pruebas, además del resultado de la prueba oxidasa, en la herramienta informática APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com>) obteniéndose la identificación del aislado.



*Figura 5. Tabla colorimétrica para la obtención de un perfil numérico de la tira API 20NE. La suma de las pruebas negativas (-) y positivas (+) por galerías generan una cifra. Según la combinación de los valores grupales se obtiene una identificación bacteriana.*

Además, de cada cepa identificada, se cogieron varias colonias de su cultivo fresco en PCA y se reservaron en un criovial (Pro-lab Diagnostics Microbank™) y en 1 mL de tampón TE 1x contenido en un Eppendorf de 1,5 mL para la conservación de la cepa y su posterior extracción de DNA, respectivamente.

### 3.5 Estudio De La Actividad Antimicrobiana De Las Cepas Aisladas

Para caracterizar el espectro de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas se realizó un antibiograma mediante el método Kirby-Bauer o disco-placa del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) que se basa en la difusión radial del antibiótico a través del agar y la consecuente inhibición del crecimiento bacteriano. Se diluyeron tantas colonias de un cultivo fresco puro como necesarias en agua salina previamente estéril (0,85%) para alcanzar una turbidez de 0,5 en escala de McFarland (Scharlau, Barcelona, Spain). Seguidamente, se extendió la dilución sobre la superficie de placas con medio Müller-Hinton (MH) (MUELLER-HINTON AGAR, Scharlau, Barcelona, Spain) con un hisopo estéril de manera uniforme. Finalmente, se depositaron en la superficie de agar de la placa los discos contenedores de los antibióticos (OXOID Antimicrobial Susceptibility Test Disc) con un dispensador (OXOID Antimicrobial Susceptibility Testing Disc Dispenser) de forma que no se superpusieran unos halos con otros. Se incubaron las placas a  $37 \pm 1$  °C durante 24 h.

Los antibióticos (Tabla 5) se seleccionaron en base a su pertenencia diferentes familias y por su relevancia en Salud Pública y/o epidemiológica.

Tabla 5. Antibióticos elegidos para estudiar la sensibilidad de los aislados.

Grupo	Antibiótico	Abreviatura	Carga del disco ( $\mu\text{g}$ )	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
				R	I	S
$\beta$ -Lactámicos	Cefotaxima	CTX	30	$\leq 14$	15-22	$\geq 23$
	Ceftazidima	CAZ	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
	Ceftriaxona	CRO	30	$\leq 13$	14-20	$\geq 21$
	Imipenem	IPM	10	$\leq 13$	14-15	$\geq 16$
	Meropenem	MEM	10	$\leq 13$	14-15	$\geq 16$
Quinolonas	Levofloxacino	LEV	5	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$
	Ciprofloxacino	CIP	5	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$
Aminoglucósidos	Gentamicina	C	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$
Anfenicoles	Cloranfenicol	CN	30	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	SXT	23,75	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$

R: resistente, I: Intermedia, S: sensible.

Transcurrido el periodo de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición (Fig.6) con una regla métrica y se anotaron los resultados en unidades de mm. Los datos obtenidos se interpretaron según los intervalos dispuestos en la Tabla 5. Así pues, se clasificó cada cepa como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) para cada antibiótico siguiendo la normativa del CLSI.

Para verificar la correcta ejecución de la técnica, se utilizó la cepa control *E. coli* ATCC 25922, como indica el CLSI para ensayar discos de antibióticos contra bacterias Gram negativas. De esta forma, se comprobó periódicamente que el procedimiento, el material y el equipo utilizados eran adecuados.

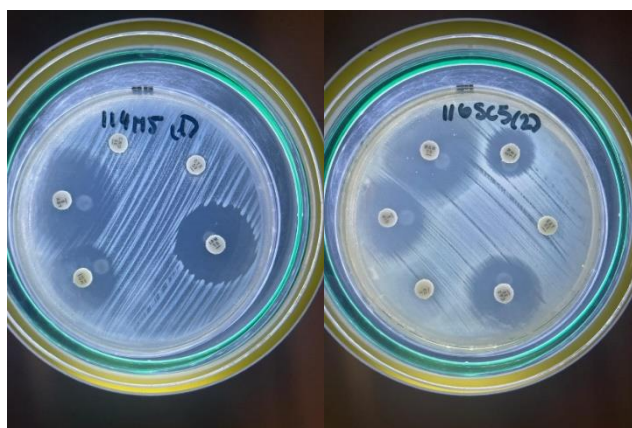


Figura 6. Placas de las cepas 114M5 (izquierda) y 116SC5 (derecha) sembradas en medio Mueller-Hinton con discos de antibióticos post-incubación.

### 3.6 Determinación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos

#### 3.6.1 Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído de los microorganismos aislados (preservados en tampón TE) y del APT sin antibiótico por una parte y de los caldos de enriquecimiento APT y TSB con

antibióticos, por otra, los cuales fueron previamente descongelados y centrifugados (4000 rpm, 10 min). Se utilizó el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich) y el DNA se extrajo siguiendo las indicaciones del fabricante para las bacterias Gram negativas. PCR multiplex

### 3.6.2 PCR multiplex

#### a. Diseño preliminar de primers

El diseño preliminar de los primers se realizó mediante una búsqueda bibliográfica basada en un análisis bioinformático de los genes diana de resistencia a carbapenemes: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>. Una vez obtenidas las secuencias complementarias necesarias para la amplificación posterior de las zonas (Tabla 6), se obtuvieron los primers (TIB MOLBIOL).

Tabla 6. Secuencias de los primers para los genes de resistencia a carbapenemes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> y tamaño esperado de sus respectivos amplicones.

Secuencia	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Referencia bibliográfica
KPC-Fm 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' KPC-Rm 5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	798	Poirel et al. (2011)
OXA-F 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' OXA-R 5'-CATCAAGTTCAACCAACCG-3'	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	438	
IMP-F 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3' IMP-R 5'-GGTTAAYAAAACAACCACC-3'	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	232	
VIM-F 5'-GATGGTGGTTGGTGCATA-3' VIM-R 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	390	

#### b. Amplificación

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

El mix de reacción consistió en tampón Tris (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), primers (0,4 µM), dNTPs (0,125 mM), enzima Taq polimerasa (BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline)(2 U), agua milliQ estéril hasta completar los 22,5µL y 2,5 µL del DNA genómico extraído. Se realizaron amplificaciones simultáneas por pares de genes para optimizar la cantidad de reactivos necesarios y el tiempo. Se diseñó de tal manera que sus productos no interfiriesen entre ellos, el gen *bla*<sub>KPC</sub> con el *bla*<sub>OXA-48</sub> y el *bla*<sub>IMP</sub> con el *bla*<sub>VIM</sub>.

Las etapas de la PCR se configuraron en el termociclador (Tabla 7) para un total de 36 ciclos siguiendo las condiciones descritas por Poirel et al. (2011), con la diferencia que en este trabajo se aumentó la temperatura de anillamiento de 52 °C a 55 °C.

Tabla 7. Condiciones empleadas en la PCR para los genes de resistencia a carbapenemes.

Programa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación inicial	94 °C	10 min	
Desnaturalización	94 °C	30 seg	36x
Annealing	55 °C	40 seg	
	72 °C	50 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	
Hold	4 °C	∞	

#### a. Electroforesis en gel de agarosa

Para la preparación del gel de agarosa, se procedió a disolver 1,2 g de agarosa E (Condalab, Madrid) en 100 mL de tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). Se llevó a ebullición y tras su atemperamiento, se añadieron 5 µL de la tinción de ácido nucleico RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Washington, USA) para permitir la revelación de bandas. A continuación, se vertió la solución polimerizante en el molde de electroforesis y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras ello, el molde se sumergió en la cubilla rellena de tampón TAE 1x del sistema de electroforesis. Finalmente, se cargaron en cada carril 6 µL del resultado de PCR de cada muestra, previamente mezclado con la tinción de DNA, además de un **marcador** molecular de peso (100 pb Plus, Sigma-Aldrich). Las condiciones de corrida del DNA fueron de 90 V durante 75 minutos. La visualización de bandas se llevó a cabo en un transiluminador (Transilluminator Vilber, Lourmat, France) con luz UV acoplado a un cómputo de captación de imágenes.

## 4. Resultados

En esta sección se presentan e interpretan los resultados obtenidos en el análisis experimental de las muestras. En primer lugar, se recogen los datos respecto a los recuentos preliminares. Acto seguido, se exponen las cepas aisladas y su perfil de resistencia. Finalmente, se detalla el estudio mediante PCR de genes de resistencia a carbapenémicos en las muestras y cepas procedentes de las diferentes condiciones de tratamiento.

### 4.1 Condiciones higiénico-sanitarias

En la Tabla 8 se recogen las medias de los recuentos de los diferentes microorganismos (viables mesófilos aerobios, coliformes totales y *E. coli*) según su producto de procedencia. Los valores obtenidos por cada muestra se recogen en la Tabla A.1 del anexo.

Tabla 8. Recuentos de los microorganismos analizados en las muestras.

Muestra	Recuentos (UFC/g) (media $\pm$ DS)		
	Viables mesófilos aerobios	Coliformes totales	<i>E. coli</i>
Espinaca	$(1,8 \pm 2,2) \times 10^7$ <sup>bc</sup>	$(0,7 \pm 1,8) \times 10^7$ <sup>bc</sup>	$(1,3 \pm 2,6) \times 10^6$
Lechuga romana	$(2,6 \pm 2,5) \times 10^7$ <sup>c</sup>	$(4,8 \pm 6,3) \times 10^6$ <sup>cd</sup>	$(0,8 \pm 1,4) \times 10^5$
Col rizada	$(1,5 \pm 1,9) \times 10^6$ <sup>ab</sup>	$(2,5 \pm 4,4) \times 10^5$ <sup>bc</sup>	$(2,5 \pm 7,1) \times 10^2$
Col lombarda	$(0,6 \pm 1,2) \times 10^6$ <sup>a</sup>	$(1,9 \pm 4,8) \times 10^5$ <sup>ab</sup>	0 $\pm$ 0
Fresa	$(2,8 \pm 6,3) \times 10^6$ <sup>a</sup>	$(2,8 \pm 3,8) \times 10^3$ <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0

\*Las letras en los superíndices diferentes muestras muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Para comparar la carga microbiológica de los diferentes tipos de muestras para cada tipo de microorganismo investigado se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Se rechazó la hipótesis nula que enuncia que no existen diferencias significativas entre sus medias poblacionales ( $p < 0,05$ ). Para determinar qué valores son significativamente diferentes unos de otros se llevó a cabo el Test de Rangos Múltiples, cuyo resultado se indica en la Tabla 8 mediante los superíndices. En la Fig 7 se muestran las medias de los recuentos en unidades logarítmicas y sus intervalos de confianza al 95%.

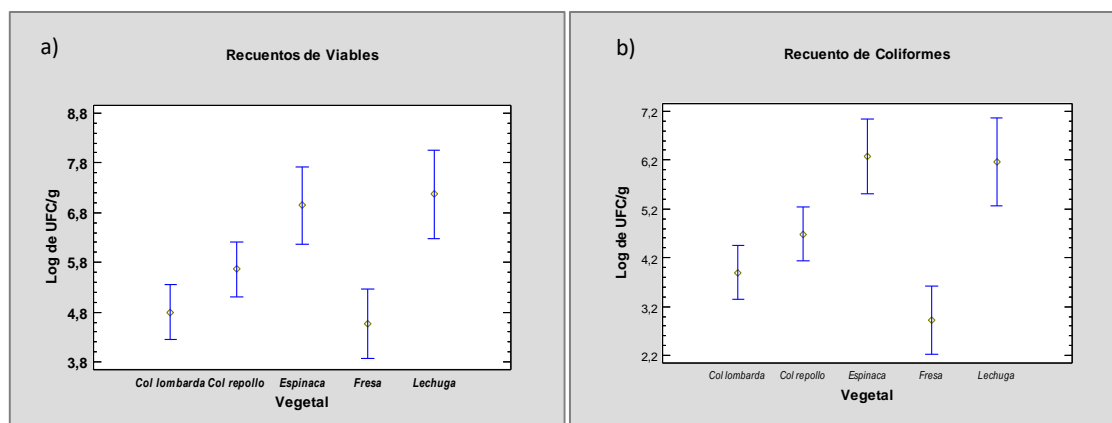


Figura 7. Medias e intervalos de confianza de los valores obtenidos en a) recuento de Viables mesófilos aerobios y b) recuentos de Coliformes; para los cinco tipos de vegetal estudiados.

Los valores de viables aerobios mesófilos varían de 915 a  $5 \times 10^7$  UFC/g, el más bajo procedente de col lombarda (EF78) y el más alto de espinaca (EF49). Como cabía esperar entre un rango tan amplio, existen diferencias estadísticamente significativas entre: lechuga y fresa; lechuga y col lombarda; espinaca y fresa; espinaca y col lombarda.

El recuento de viables aerobios mesófilos indica la idoneidad del control de temperatura y sanidad durante el procesamiento, transporte y almacenamiento, y revela las fuentes de contaminación durante la fabricación. No determina la presencia de microorganismos patógenos por lo que no se considera una evaluación directa de seguridad. Dado que en este estudio las muestras son vegetales y frutos frescos, y estos tienen una microbiota bacteriana de base alta, el límite establecido en base a trabajos preliminares y normas recomendadas es  $< 1 \times 10^5 / 10^6$  UFC/g (de Curtis et al., 2000; de Pablo & Moragas, 2000). De los recuentos realizados, seis tuvieron un valor superior, dos correspondientes a espinaca (EF49, EF69), dos a lechuga (EF54, EF89) y uno a fresa (EF114).

En el caso de los valores de coliformes totales, el rango se colocó entre 100 y  $2,8 \times 10^7$  UFC/g, perteneciendo el menor a fresa (EF114) y el mayor a espinaca (EF69). Los niveles de coliformes se distinguieron en dos, por una parte, los dos tipos de coles y las fresas en uno más bajo y la espinaca y lechuga en otro más alto. Generando así una diferencia significativa entre ambos niveles. Se estableció el límite higiénico en  $10^4$  UFC/g (de Busto & Moragas, 2000.). Este fue superado por 10 muestras, 4 de espinaca (EF49, EF69, EF75, EF86), 2 de lechuga (EF54, EF89) y 4 de col (EF70, EF90, EF115, EF1116).

En cuanto a los recuentos de *E. coli*, se detectó solamente, en 3 de las 47 muestras, una de espinaca (EF69), una de lechuga (EF89) y una de col (EF115). En este caso, el análisis ANOVA muestra algo de no normalidad en los datos, por lo que se llevó a cabo el Test de Kruskal-Wallis que compara las medianas, el cual nos indicó que no existen diferencias significativas entre ellas ( $p \geq 0,05$ ).

Por último, el Reglamento (CE) 2073/2005, establece el límite higiénico aceptable en 1000 UFC/g para *E. coli*. En dos de las muestras donde se halló el microorganismo (EF69, EF89), se superó este valor.

#### 4.2 Aislamiento e identificación bioquímica de cepas de interés

Se obtuvieron un total de 280 aislados a partir de las muestras analizadas en este estudio, 140 procedentes de cultivos en medio MacConkey suplementado con cefatoxima y 140 procedentes de cultivos en medio Supercarba suplementado con carbapenemes. De estas, 260 aislados cumplían los requisitos de ser Gram negativas, oxidasa y catalasa positivo.

Al proceder de caldos pre-enriquecidos con suplementos de antibióticos, presumiblemente, había más probabilidad de detectar resistencias en los aislados. Ello nos llevó a seleccionar un número más reducido de aislados (47) con los que trabajar, tratando de abarcar todas las muestras. 35 aislados provenían del medio mSuperCARBA y 12 del medio MacConkey. Teniendo en cuenta el origen: 16 aislados procedían de col rizada, 13 de col lombarda, 7 de espinaca, 6 de fresa y 5 de lechuga.

Los resultados de la identificación por tira API 20NE se muestran en la Tabla 8. Se identificaron un total de 10 especies distintas, siendo el género *Pseudomonas* el más abundante (33 aislados) con una prevalencia del 70,12%.

Tabla 9. Listado de las especies aisladas de vegetales crudos y fresa, incluyendo su número de aislados y nº de muestras de las que se obtuvieron.

Especie	Nº aislados	Nº muestras
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	Col rizada (6), col lombarda (5), fresa (1)
<i>Pseudomonas putida</i>	19	Lechuga (4), espinaca (5), col lombarda (5), col rizada (3), fresa (2)
<i>Pseudomonas luteola</i>	1	Fresa (1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Espinaca (1)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	Espinaca (1), Fresa (1)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1	Fresa (1)
<i>Ralstonia pickettii</i>	4	Col rizada (2), col lombarda (2)
<i>Burkholderia cepacia</i>	3	Lechuga (1), col rizada (1), col lombarda (1)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2	Espinaca (1), col rizada (1)
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2	Espinaca (1), col rizada (1)
<i>Total aislados ensayados</i>	47	

En la Fig. 8 se muestran las proporciones de las distintas especies identificadas según el medio de cultivo. A pesar de que el tamaño muestral del medio MC era menor (12) al de SC (35), estos tienen una heterogeneidad similar. En ambos casos, *P. putida* y *P. fluorescens* constituyen un alto porcentaje. *P. aeruginosa*, se pudo distinguir en MC ya que crece con pigmentación fluorescente en un color verdoso marrón. El medio SC se desarrolló específicamente para la detección de bacterias con carbapenemasas, es por ello por lo que entre las especies de aislados se encuentra *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingobacterium multivorum*, las cuales tienen un historial de resistencia a carbapenemes.

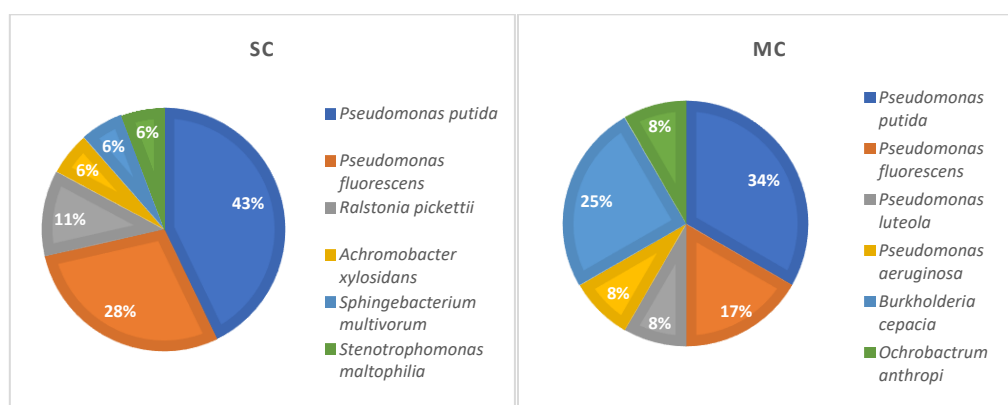


Figura 8. Especies identificadas en el medio mSuperCARBA (SC) y MacConkey (MC).



### 4.3 Perfil de resistencia antibiótica de los aislados

En la Tabla 10 se muestran los patrones de resistencia observados tras llevar a cabo los antibiogramas de los aislados.

Tabla 10. Perfiles de resistencia definitiva a antibióticos mostrados por las cepas aisladas.

Patrones de resistencia	Nº de aislados	Identificación
CAZ	1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
CTX	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SXT	18	<i>Pseudomonas putida</i> (11) <i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> (2), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (4)
CAZ-SXT	1	<i>Pseudomonas putida</i>
CAZ-CN	1	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
CRO-CTX	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2)
CTX-SXT	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2)
SXT-C	4	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Achromobacter xylooxidans</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> (2)
CRO-CTX-CAZ	1	<i>Pseudomonas luteola</i>
CTX-SXT-C	2	<i>Achromobacter xylooxidans</i> , <i>Ralstonia pickettii</i>
CRO-CTX-MEM-SXT-CAZ	1	<i>Pseudomonas putida</i>
CRO-IPM-CTX-MEM-CAZ	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
CRO-IPM-CTX-MEM-C-CAZ-CIP	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, SXT: sulfametoxazol, CN:cloranfenicol, CRO: ceftriaxona, C: gentamicina, MEM: meropenem, IPM: imipenem

De los 47 aislados ensayados, 36 mostraron algún tipo de resistencia a los antibióticos testados, reflejándose en 13 patrones o perfiles distintos; 3 perfiles de resistencia a un único antibiótico, 5 perfiles de resistencia a 2 antibióticos, 2 perfiles de 3 antibióticos, 2 de 5 antibióticos y 1 que mostró resistencia a 7 antibióticos.

Es de destacar que 5 perfiles se componen exclusivamente de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, englobando un total de 5 aislados (4 pertenecientes al género *Pseudomonas*).

Cerca del 60% (27 de 47) de los aislados mostraron resistencia frente a SXT, perteneciendo mayoritariamente al género *Pseudomonas*. Once aislados mostraron resistencia frente a CTX y 7 frente a CAZ y C, siendo también *Pseudomonas* el género predominante.

De los resultados obtenidos, 3 cepas manifestaron multiresistencia ya que presentaron resistencia a al menos 3 familias distintas de antibióticos. *Achromobacter xylooxidans* y *Ralstonia pickettii* presentaron resistencia a CTX, SXT y C y *Stenotrophomonas maltophilia* a CRO, IPM, CTX, MEM, C, CAZ y CIP. Por lo tanto, 8,6% de los aislados resultaron ser multiresistentes.

En la Figura 9 se puede apreciar la susceptibilidad de los 47 aislados de forma conjunta incluyendo los tres tipos de respuesta (sensible, intermedio y resistente).

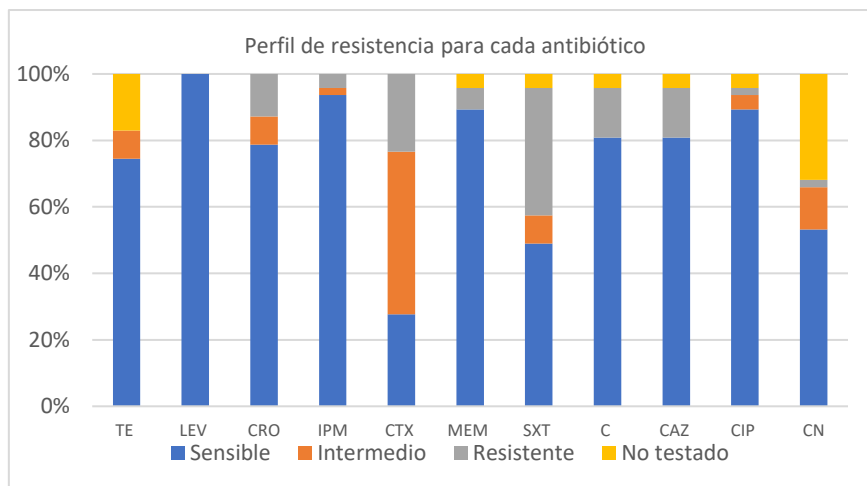


Figura 9. Recopilación por antibióticos del perfil de resistencia de las aislados. No testados: a causa de falta de suministro en el momento del experimento.

Únicamente un antibiótico, el levofloxacino (LEV), de la familia de las quinolonas, no ha suscitado ninguna resistencia en las cepas aisladas. Sin embargo, para los otros 10, se han observado resistencias, ya bien intermedias o definitivas. El antibiótico con **mayor resistencia** fue cefotaxima (CTX) (>72%), con un 48,9% de los aislados con resistencia intermedia y un 23,4 % con resistencia definitiva. Le sigue sulfametoxazol (SXT) (>46%), con un 8,5% de cepas con resistencia intermedia y un 38,29 % de definitiva. Además, casi el 15% de los aislados fueron resistentes a gentamicina (C) y ceftazidima (CAZ). Por otra parte, resistencias intermedias se han notificado para cloranfenicol (CN) en un 12,76% de las cepas y, tetraciclina (TE) y ceftriaxona (CRO) por igual en un 8,5%. Los antibióticos con mayor porcentaje de aislados sensibles son el grupo de carbapenémicos dentro de la familia  $\beta$ -lactámicos, con porcentajes del 93,61% para el imipenem (IPM) y 89,36% para el meropenem (MEM).

En la Fig.10 se muestra gráficamente el estudio comparativo de las resistencias a los antibióticos ensayados según el tipo de vegetal a partir del cual se aisló cada cepa identificada. Para la espinaca (Fig. 10 a), se observa que el antibiótico sulfametoxazol (SXT) tiene una resistencia notable entre los aislados (83,3%), le sigue el meropenem (MEM) y la cefotaxima (CTX) con resistencia intermedia del 57% y la tetraciclina (TE) con un 42,85%. El resto de los antibióticos tienen cuantías de resistencia más pequeñas menos para el levofloxacino (LEV) que fueron todas sensibles.

En el gráfico (Fig.10 b), destaca que todos los aislados de lechuga tuvieron resistencia intermedia a la cefotaxima (CTX) y notable al sulfametoxazol (SXT). Por otra parte, también un porcentaje considerable (40%) fueron resistentes a la gentamicina (C).

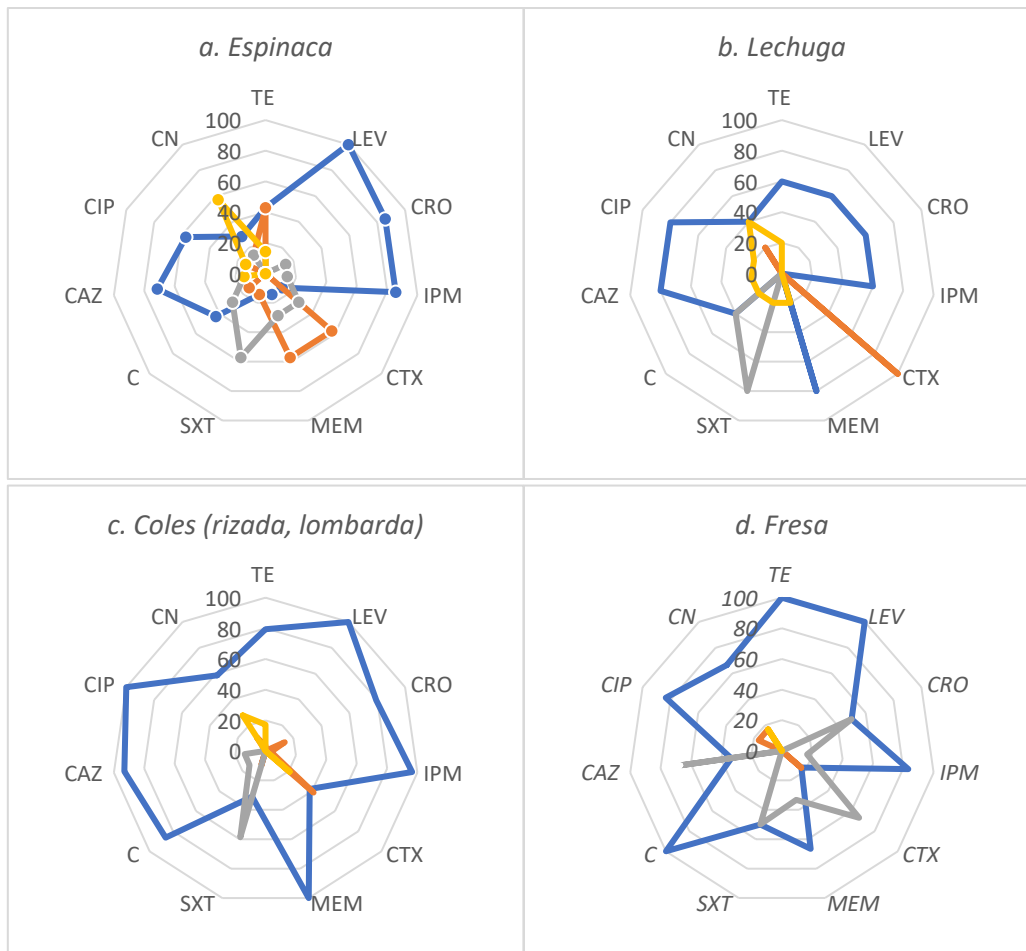


Figura 10. Susceptibilidad antimicrobiana de los diferentes productos (%). (a: Espinaca (n= 7); b: Lechuga (n= 5); c: Coles (n= 29); d: Fresa (n= 6)). Con trazado azul se representan los aislados sensibles, con naranja los resistentes intermedios, en gris los resistentes y en amarillo los no testados.

Las coles fueron el producto más testado, con un total de 29 aislados (Fig. 10 c). Se puede apreciar como el sulfametoxazol (SXT) es de nuevo el antibiótico con mayores resistencias con un 58,6% y le sigue la cefotaxima (CTX) con resistencia intermedia del 41,4%.

Finalmente, para las fresas hay un diagrama más heterogéneo (Fig. 10 d), en el que se vislumbran resistencias significativas para la ceftriaxona (CRO, 50%), la cefotaxima (CTX, 66,7%), el sulfametoxazol (SXT, 50 %) y la ceftazidima (CAZ, 66,7%). En adición y en menor medida, tienen resistencia a los carbapenémicos, al imipenem (IPM) con un 16,7% y al meropenem (MEM) con un 33,3%.

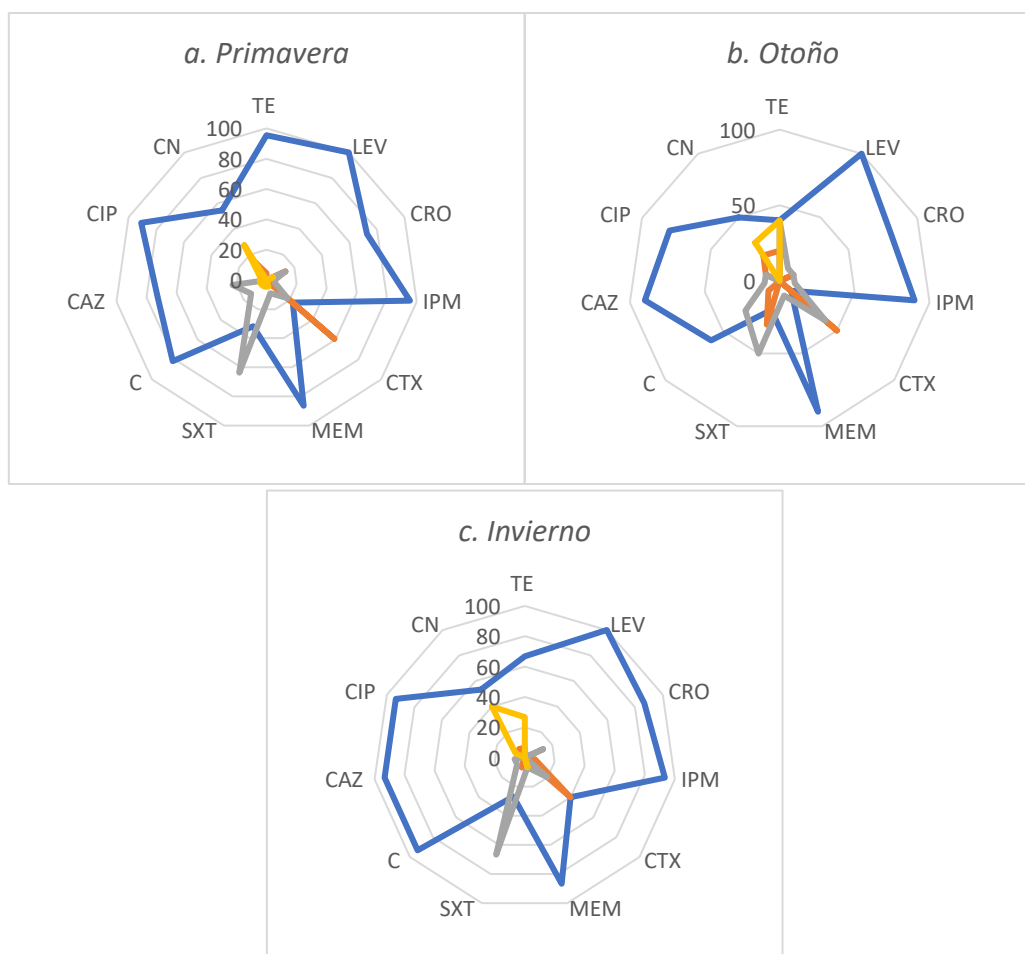


Figura 11. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados por época del ensayo expresada en % de cepas. a: Primavera (n= 22); b: Otoño (n= 10); c: Invierno (n= 15). Con trazado azul se representan los aislados sensibles, con naranja los resistentes intermedios, en gris los resistentes y en amarillo los no testados.

Invierno (Fig. 11 c) es la estación con menor número de resistencias, la más pronunciada es la del sulfametoxazol (SXT) con un 66,7%. En menor medida le sigue el antibiótico cefotaxima (CTX) con una intermedia del 40 % y definitiva del 20 %. Finalmente, el resto de los antibióticos tienen cierta resistencia menos el levofloxacino (LEV) y el ciprofloxacino (CIP).

En comparación, otoño (Fig. 11 b) tiene resistencias para todos los antibióticos y en mayor porcentaje. Al igual, la primavera (Fig. 11 a) tiene más resistencia que invierno, pero menos que otoño, con la excepción del ciprofloxacino (CIP) para el cual se ha detectado una resistencia del 22,72%.

El hecho de que aparecieran más bacterias resistentes en otoño puede deberse a que en esta época del año hay una mayor carga microbiológica en los alimentos debido a las grandes precipitaciones que tienen lugar en esos meses en el Mediterráneo y a la humedad consecuente en el campo.

#### 4.4 Estudio De La Detección De Genes De Resistencia Carbapenemes

Para determinar la resistencia a carbapenemes, pertenecientes a la familia de los  $\beta$ -lactámicos, se llevó a cabo una PCR multiplex para los genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ,  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{VIM}$ . La prueba se

realizó sobre diluciones de la muestra realizadas en APT sin antibiótico, y en los pre-enriquecimientos en APT y TSB suplementadas con antibiótico, así como con las 47 cepas aisladas e identificadas.

No se detectó amplificación de ninguno de los genes estudiados en las muestras procedentes de APT sin y con antibiótico. Sin embargo, en 4 muestras de TSB se detectaron los genes *bla*<sub>IMP</sub>, y *bla*<sub>VIM</sub> (Tabla 10). Una procedente de espinacas, otra de col rizada y dos de col lombarda, dos fueron recolectadas en otoño (espinaca, col rizada) y en invierno (col lombarda).

Tabla 11. Genes detectados en las muestras procedentes de caldo TSB + MEM+VAN.

Producto	Muestra	<i>bla</i> <sub>OXA-48r</sub>	<i>bla</i> <sub>KPCr</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
Espinaca	EF69	-	-	+	-
Col rizada	EF73	-	-	+	+
Col lombarda	EF76	-	-	+	-
	EF77	-	-	-	+

Los resultados del análisis por PCR del ADN procedente de los aislados se muestran en la Tabla 12. De las 47 cepas analizadas, 12 mostraron poseer alguno de los genes de resistencia a carbapenemes, lo que representa un 25,5% de las cepas estudiadas. Cabe destacar que 8 de ellas pertenecen a la familia de *Pseudomonas spp.*, es decir, un 66,7%.

Tabla 12. Genes detectados en los aislados identificados.

Producto	Cepa	<i>bla</i> <sub>OXA-48r</sub>	<i>bla</i> <sub>KPCr</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>
Espinaca	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	-	-	-	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+	-
Col lombarda	<i>Ralstonia pickettii</i>	-	+	-	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	+	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	+
Col rizada	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	+	-
Lechuga	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+	-
Fresa	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	-	+	-
	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+	-
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	+	-
	<i>Pseudomonas luteola</i>	-	-	+	-

Por último, en la Tabla 13 se muestra la frecuencia de detección de los genes (%) en el total de cepas aisladas por tipo de producto. El gen más prevalente en los aislados es el *bla*<sub>IMP</sub>, para todos los tipos de vegetal, seguido de *bla*<sub>VIM</sub>, presente en el 14,28% de los aislados de espinaca y 7,7 % de los aislados de col lombarda. Por último, señalar que el gen *bla*<sub>KPC</sub> ha sido detectado únicamente en aislados de col lombarda. Así mismo, en los aislados de fresa únicamente se

detectó el gen *bla<sub>IMP</sub>* aunque en un porcentaje alto (66,67%) en contraste con la col lombarda, en cuyos aislados se detectaron los tres genes estudiados.

Tabla 13. Frecuencia de detección de los genes *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>* en los aislados según tipo de producto.

Producto (nº de aislados)	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	<i>bla<sub>VIM</sub></i>
Espinaca (7)	0,00 %	14,28 %	14,28 %
Lechuga (5)	0,00 %	20 %	0,00 %
Col rizada (16)	0,00 %	12,5 %	0,00 %
Col lombarda (13)	7,69%	7,69%	7,69%
Fresa (6)	0,00 %	66,67 %	0,00 %

## 5 Discusión

### 5.1 Calidad higiénico-sanitaria de las muestras de vegetales ecológicas

Los niveles de viables aerobios mesófilos encontrados en las muestras varían de 915 a  $5 \times 10^7$  UFC/g por lo que en algunos casos se supera el límite establecido  $1 \times 10^5$  - $10^6$  UFC/g. Este límite es mayor que el fijado para coliformes y *E. coli*, ya que la presencia de estos implica contaminación de origen fecales. Hay que tener en cuenta que los coliformes se encuentran de manera natural en la microbiota normal de los vegetales crudos.

Se observó un mayor número de viables aerobios mesófilos en vegetales de hoja verde (lechuga y espinaca) en comparación con la col y la fresa. La distribución coincide con la observada para lechuga por Xylia et al. (2019), donde la media de 7,73 log UFC/g queda muy cercana a la media de lechuga de este trabajo (7,3). La diferencia que se ha encontrado en la bibliografía es que la espinaca suele tener más carga microbiológica de aerobios mesófilos que la lechuga (Soendjoj, 2012). La razón puede ser la diferencia en la composición de la superficie y de la morfología de las hojas favoreciendo en mayor o menor grado la adherencia y colonización por parte de los microorganismos. La media logarítmica de espinaca se situó en 7 log UFC/g, valor más alto que el observado en otros estudios (Tango et al., 2014). En el caso de las muestras de col, la media logarítmica fue 5,6 para la rizada y 4,8 para la lombarda, recuentos parecidos al observado por Kuan et al. (2017), que fue 5,82 para las orgánicas. Finalmente, la media de las fresas de 4,5 queda por encima de la media de 3.78 de Ortiz-Solà et al. (2020), aunque se parece a la observada por Hassenberg et al. (2010). Durante la producción de las fresas, estas son mínimamente procesadas para evitar el daño y el riesgo de deterioro. Actualmente, el reglamento de la UE sobre criterios de carga microbiana para alimentos (EC 2073/2005 y modificaciones a posteriori) no incluye los límites máximos en fruta fresca y hortalizas.

En cuanto a los recuentos de coliformes totales, un 37 % de las muestras superaron el límite higiénico preestablecido ( $10^4$  UFC/g). Más concretamente, un 100 % de las espinacas lo superaron, un 66,7% de lechuga y un 25% de col. El hecho de que estos microorganismos estuvieran presentes en la verdura, pero no en la fruta, puede deberse a que las hortalizas están en contacto con la tierra y pueden ser colonizadas por bacterias del suelo con mayor facilidad. Para evitarlas pues, se deberían de descartar las hojas más externas y lavar el resto de las hojas con un 1,5 mL de lejía/1 L de agua antes de consumirlas como indica la Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. Los valores de las verduras para coliformes variaron entre 150 y  $2,8 \times 10^7$  UFC/g, estos quedan ligeramente por encima de los observados por Mukherjee et al. (2004). Para la fruta, la media logarítmica de coliformes fue 2,9  $\log_{10}$  UFC/g, esta es similar a la observada por Ortiz-Solà et al. (2020), que fue 2,15. Roth et al. (2018) encontraron niveles de coliformes totales más bajos para las fresas, con una media de 0,52  $\log_{10}$  UFC/g.

*E. coli* se detectó en un 11,11 % de las muestras. Dos de ellas, lechuga y espinaca superaron el límite aceptado por el Reglamento (CE) 2073/2005 de 1000 UFC/g. Si comparamos este análisis con la bibliografía, es similar a recuentos de Abadias et al. (2008) y Xylia et al. (2019). Para la fresa no se detectó este patógeno como en el estudio realizado por Ortiz-Solà et al. (2020). A diferencia de las bacterias mesófilas viables y las coliformes, *E. coli*, sí que implica patogenicidad directa. Es indicador de una contaminación fecal reciente. Por ello, es recomendable que si la

verdura y fruta comprada, ha estado en contacto con estiércol y no tratada, se cocine, con tal de que el tratamiento térmico elimine posibles patógenos.

En resumen, aunque los valores para viables aerobios mesófilos se encontraron dentro de los límites establecidos, algunas muestras de verdura superaron el límite higiénico aceptado para coliformes. En lechuga y espinaca, se encontró la mayor carga de coliformes y presencia de *E. coli* excediendo el límite higiénico establecido

## 5.2 Identificación bioquímica de las cepas aisladas

*Pseudomonas* spp. fue el género más común (33 de 47 cepas), este se ha identificado en ambientes muy diversos y algunas especies pueden ser patógenos de plantas o animales (Butiuc-Keul et al., 2021). Además, estos bacilos gramnegativos y fluorescentes son habitantes comunes de las superficies de plantas. Entre estas, *P. aeruginosa*, que en este trabajo se halló en una muestra de espinaca (EF86), está involucrada en infecciones con altas tasas de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunodeprimidos, ya que presenta resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos a parte de la adquirida y adaptativa. Esta característica se puede deber a que tiene un genoma relativamente grande, lo que le permite tener una adaptabilidad codificadora mayor. Además, este patógeno oportunista está en el punto de mira ya que recientemente se ha constatado un aumento significativo de la aparición de resistencias a carbapenemes. Es uno de los géneros bacterianos de la lista de la WHO que incluye a las tres especies más críticas. Por su grado de importancia, Europa ha establecido un programa de vigilancia y los resultados del 2020 sobre los aislados encontrados se ilustran en la Fig.12.

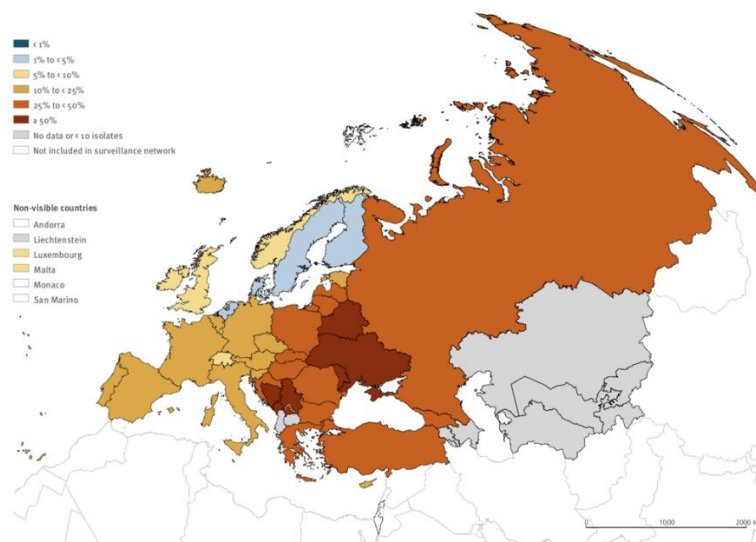


Figura 12. Porcentaje de aislados invasivos con resistencia a carbapenemes (imipenem/meropenem), por país y área. WHO Región Europea, 2020. (Comisión Europea. Public Health,.)

Destaca también, la especie *Stenotrophomonas maltophilia*, aislada en espinaca y fresa. Esta bacteria es un patógeno emergente que suele encontrarse en ambientes acuáticos y que la WHO ha clasificado como uno de los principales organismos resistentes a múltiples fármacos (MDRO) en entornos hospitalarios (Chang et al., 2015).



El resto de las especies identificadas (*Ochrobactrum anthropi*, *Ralstonia pickettii*, *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Sphingobacterium multivorum*), son bacterias oportunistas que suelen ser aisladas en pacientes hospitalizados y para las cuales no se tiene amplio conocimiento de sus resistencias antimicrobianas.

### 5.3 Resistencia a antibióticos de los aislados

Se ha observado una alta incidencia de resistencia a los antibióticos ensayados (93,6%) entre las bacterias gramnegativas, citocromo oxidasa y catalasa positivas aisladas de espinacas, lechugas, coles y fresas a nivel minorista valenciano. De las 47 cepas aisladas, solamente 3 de ellas, identificadas como *Sphingobacterium multivorum* (espinaca), *Pseudomonas putida* (col rizada) y *Pseudomonas fluorescens* (col rizada) no presentaron ninguna resistencia.

En cuanto a antibióticos, el levofloxacino (LEV), fue el único que en la prueba de antibiogramas suscitó sensibilidad en todos los aislados ensayados. Este resultado era esperado ya que este antibiótico suele presentar resistencias en la especie *Helicobacter pylori* (Hölzel et al., 2018). En el otro extremo, el antibiótico con más incidencia de resistencia fue la cefotaxima (CTX), que presentó un 48,9% de resistencia intermedia y un 23,4% de definitiva (total de 34/47 cepas). Esto es comparable al 75,47% (40/53) observado en aislados fermentativos de vegetales frescos analizado por Chelaghma et al. (2022) y el 53,6% de Walia et al. (2012) encontrado en bacterias gram negativas de espinaca. Le siguió de cerca el sulfametoxazol (STX) con un 38,9% de resistencia definitiva y 8,51% de intermedia, de nuevo, este resultado es cercano al de otros estudios, como el de Campos et al. (2013), en el cual un 50 % de las bacterias gram negativas procedentes de lechuga, presentaron resistencia en medios pre enriquecidos con este antibiótico. Esta alta transmisión, puede ser debida a que el sulfametoxazol, es uno de los antibióticos más vendidos del mundo y está clasificado en alta prioridad en el ámbito veterinario (Boxall et al., 2003).

Aproximadamente un 9% de las cepas recuperadas fueron MDR, estas fueron *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Ralstonia pickettii*. Este porcentaje queda lejos del 23 % observado por Bezanson et al. (2008) y del 30% visualizado en bacterias Gram negativas (Österblad et al., 1999). Esta disparidad se puede deber a que la muestra de análisis fue mucho menor en este trabajo.

Una gran proporción de las cepas AR detectadas (>90%) fueron insensibles a la acción de los antibióticos de tipo betalactámico. Esto se ha denotado con anterioridad en otros estudios de aislados gramnegativos asociados a plantas de consumo alimentario Boehme et al. (2004); Hamilton-Miller & Shah (2001).

De los 4 productos analizados, la espinaca fue en el que más resistencias se encontraron. En el estudio de Bezanson et al. (2008) donde se estudiaron las bacterias Gram negativas presentes en cultivos canadienses de lechuga, coles de Bruselas y espinacas, también se elucidó que en los aislados de espinaca había más resistencias. En cuanto a las estaciones, otoño es la época del año en la que más cantidad de perfiles de resistencia se cuantificaron.

Los aislamientos caracterizados se seleccionaron de dos medios pre enriquecidos. Por una parte, del medio MackConkey (MC + VAN + CTX) se esperaba que todos los aislados fueran resistentes

a cefalosporinas de tercera generación (CTX, CRO, CAZ), y en efecto, todos ellos resultaron serlo a alguno o varios de estos antibióticos. Al igual, del medio mSuperCARBA (SC+VAN+MEM) se esperaba que los aislados fueran resistentes a carbapenemes (MEM, IMP), y en este caso, solo en un 8,5 % se detectó para resistencia a uno o ambos antibióticos mencionados. El hecho de que no todos ellos demostraran resistencia en la prueba de antibiograma, se debe a que, en esta, la concentración inhibitoria es mucho mayor que la aplicada en el enriquecimiento de los caldos de cultivo. Por ello, incluso habiendo triado las bacterias de partida con un crecimiento selectivo, se aislaron bacterias resistentes a otros antibióticos.

#### 5.4 Detección de genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos

De los cuatro ARGs estudiados, el *bla<sub>oxa-48</sub>* no se halló en ninguna muestra ni aislado. Esto puede ser debido a que el gen que codifica para la carbapenemasa similar a la oxacilina 48 (OXA-48, clase D), suele aparecer en ambientes hospitalarios, ya que está relacionada con infecciones urinarias con frecuencia provocadas por *Klebsiella pneumoniae*. Además, esta carbapenemasa tiene la mayoría de sus reservorios en países no europeos (Poirel et al., 2012).

En la muestra de APT y APT pre enriquecida no se detectó ningún gen, ya que en ninguna de estas condiciones se aplicó una presión selectiva para la expresión de carbapenemasas. Sin embargo, en las cepas identificadas a partir del medio MacConkey a su vez con origen del caldo de APT pre enriquecido, sí que se detectaron genes de resistencia. En concreto, de 10 cepas de MC identificadas, 3 contenían el gen de resistencia *bla<sub>IMP</sub>*.

Al contrario, en el medio de TSB, sí que se ejerció una selección con la suplementación del antibiótico meropenem, y es gracias a ello, que se observaron en 4 muestras los genes productores de metalobetalactamasa (MBL) *bla<sub>IMP</sub>* y/o *bla<sub>VIM</sub>*. Estas betalactamasas son las más extendidas y habitualmente detectadas. A pesar de que en estas muestras se hallaran genes de resistencia, las cepas aisladas a partir de 3 de ellas (69, 73, 76), no presentaron ninguno. Esto puede deberse a que las bacterias responsables de la resistencia en el medio TSB, fueran viables, pero no cultivables. Esto no se corresponde a la cepa EF69SC2 (*Stenotrophomonas maltophilia*) obtenida a partir de la muestra 69. Ya que esta sí que se aisló en cultivo y presenta resistencia fenotípica a ambos carbapenemes testados (IMP, MEM). La explicación por la cual las PCRs han resultado negativas en este caso, es que esta especie produce naturalmente la MBL L1 de manera inducible, por lo que es intrínsecamente resistente a esta clase de antibióticos (Brooke, 2012).

En las PCR de las cepas se detectaron los genes *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*. Además, se encontró el gen *bla<sub>KPC</sub>* en una muestra de col lombarda (EF74SC2) de *Ralstonia pickettii*. La carbapenemasa *Klebsiella pneumoniae* (KPC, clase A), nombrada a partir de esta bacteria en la que originalmente se identificó, es codificada principalmente por plásmidos en enterobacterias (Nicolau & Oliver, 2010). En la literatura, no se han encontrado casos dónde *Ralstonia pickettii* codifique para *bla<sub>KPC</sub>*, tanto en el estudio de Lucarelli et al. (2017) como en el de Basso et al. (2019), las bacterias procedentes de muestras de pacientes pese a ser resistentes a carbapenemes dieron negativo en la PCR de este ARG. La disparidad puede ser consecuencia de la diferencia en el origen de la cepa, ya que en este trabajo proviene de una muestra de verdura y no de origen humano.

El estudio de la presencia de los genes mencionados permite la correlación entre las características fenotípicas de sensibilidad y las genotípicas moleculares. Permitiendo así esclarecer una mayor comprensión de los patrones generales de resistencia, así como la identificación de sus mecanismos. Las cepas EF78SC2, EF114SC4 demostraron en el antibiograma tener resistencia a IPM, y a IPM y MEM, respectivamente, y en ambas se detectó el gen *bla*<sub>IMP</sub>. Sin embargo, para el resto de las cepas en las que se detectaron alguno de los genes no presentan resistencia en el antibiograma, esto se puede deber a que la concentración del antibiótico aplicada sea demasiado alta para la expresión. Aunque, dada la rápida evolución en el mundo microbiano, cabría esperar que estas cepas adaptaran su metabolismo. Esto se podría comprobar sometiendo las cepas a varias rondas de antibióticos a concentraciones menores. Otra explicación podría ser que el gen esté presente en estas bacterias en una forma no funcional (mutado, incompleto) o en una célula muerta o como DNA extracelular, y no pueda expresarse suficientemente y ejercer resistencia fenotípica.

En cuanto a la prevalencia en producto, un 20% de las cepas aisladas de lechuga y un 66,67% de las aisladas en fresa contenían el gen *bla*<sub>IMP</sub>. En el artículo de Vázquez-López et al. (2018) dónde se analizaron muestras de lechuga, se observó un porcentaje muy cercano al obtenido en este trabajo, con un 16,7% de aislados presentando el gen *bla*<sub>IMP</sub>.

## 6 Conclusiones

El estudio planteado referente a las condiciones higiénico-sanitarias de los vegetales y fruta ecológicos crudos ha mostrado en general unos valores adecuados. Aunque, en una muestra de espinaca y otra de lechuga, se detectó *E. coli* en cantidades que conllevan un potencial riesgo para la salud.

La mayoría de las cepas identificadas en este trabajo pertenecieron al género *Pseudomonas* spp., destacando el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista prioritario para la WHO por sus resistencias a carbapenemes; al igual que el aislamiento de *Stenotrophomonas maltophilia*, multirresistente, lo cual indica que el consumo de estos vegetales crudos puede ser un riesgo para individuos inmunocomprometidos si no se lavan y/o cocinan adecuadamente.

La cefotaxima y sulfametoxazol fueron los antibióticos que mostraron más resistencias entre los aislados.

La tasa de multi-resistencia entre los aislados indica que los vegetales pueden ser un eslabón importante en la transmisión de resistencias antimicrobianas a la población que los consume.

El enriquecimiento de los caldos suplementados con antibióticos favoreció el aislamiento de bacterias resistentes a  $\beta$ -lactámicos y la detección de los genes de resistencia investigados.

Estos resultados son de gran importancia para la comunidad científica en el contexto de *One Health* y la lucha contra las resistencias antimicrobianas y su impacto, de forma global, en el medio ambiente.

Se hace manifiesta la necesidad de una vigilancia continua de los alimentos y prácticas agrarias y medioambientales como factores en la propagación de resistencias antimicrobianas como mecanismos de protección en Salud Pública.

## 7 Bibliografía

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 121-129. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.12.013>
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697-705. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
- Alegbeleye, O. O., Singleton, I., & Sant'Ana, A. S. (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food Microbiology*, 73, 177-208. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.01.003>
- Alós, J. I. (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>
- Anderson M, Clift C, Schulze K, et al. (2019). Averting the AMR crisis: What are the avenues for policy action for countries in Europe?. European Observatory on Health Systems and Policies, Copenhagen (Denmark); 2019. <http://europepmc.org/books/NBK543406>
- Basso, M., Venditti, C., Raponi, G., Navazio, A. S., Alessandri, F., Giombini, E., Nisii, C., di Caro, A., & Venditti, M. (2019). A case of persistent bacteraemia by *Ralstonia mannitolilytica* and *Ralstonia pickettii* in an intensive care unit. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2391-2395. <https://doi.org/10.2147/IDR.S206492>
- Bezanson, G. S., MacInnis, R., Potter, G., & Hughes, T. (2008). Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), 37-42. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.06.008>
- Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R., & Witte, W. (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 48(7), 522-531. <https://doi.org/10.1002/MNFR.200400030>
- Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Kay, P., Blackwell, P. A., Pemberton, E. J., & Croxford, A. (2003). Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicology Letters*, 142(3), 207-218. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00067-5)
- Brogan, D. M., & Mossialos, E. (2016). A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. *Globalization and Health* 12(8) 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12992-016-0147-y>
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 2-41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
- Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 529:336-343 <https://doi.org/10.1038/nature17042>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2019). Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology* 17(5),295-306. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0159-8>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2) <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>
- Butiuc-Keul, A., Carpa, R., Podar, D., Szekeres, E., Muntean, V., Iordache, D., & Farkas, A. (2021). Antibiotic Resistance in *Pseudomonas* spp. through the Urban Water Cycle. *Current Microbiology*, 78(4), 1227-1237. <https://doi.org/10.1007/S00284-021-02389-W/TABLES/3>

- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., & Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384-394. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.01.035>
- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., & Antunes, P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 464-470. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.08.005>
- Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11-48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Cars, O., & Nordberg, P. (2005). Antibiotic resistance-The faceless threat. *International Journal of Risk & Safety in Medicine* 17, 103-110
- Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Frontiers in Microbiology*, 6, 893. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00893>
- Charpentier, X., Polard, P., & Claverys, J. P. (2012). Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: Convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? *Current Opinion in Microbiology* 15 (5), 570-576. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.001>
- Chelaghma, W., Loucif, L., Bendjama, E., Cherak, Z., Bendahou, M., & Rolain, J.M. (2022). Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria. *Antibiotics*11(8), 988. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11080988>
- Cheng, G., Ning, J., Ahmed, S., Huang, J., Ullah, R., An, B., Hao, H., Dai, M., Huang, L., Wang, X., & Yuan, Z. (2019). Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/S13756-019-0623-2>
- Comisión Europea. Public Health. (2022). *Acción de la UE en materia de resistencia a los antimicrobianos*. [https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance\\_es](https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_es)
- Comisión Europea (2018). A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). [https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr\\_2017\\_action-plan\\_0.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf)
- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 338. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00338/XML/NLM>
- de Curtis, M. L., Franceschi, O., & de Castro, N. (2000). Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(2), 177-182. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-622200000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-622200000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- De Pablo, B. & Moragas, M. (2000). Recopilación normas microbiológicas de los alimentos y asimilados de otros parámetros fisicoquímicos de interés sanitario. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos* 317, 19-50.
- Doyle, M.P. & Erickson, M.C. (2006). Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science*, 74, 98-112
- Dowling, A. M., O'dwyer, J., & Adley, C. (2017.). *Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance*. Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs (Ed. Méndez-Vilas) Formatex research center, pp 536-545,

- EASAC ( European Academies.science Advisory Council) (2007). Tackling antibacterial resistance in Europe. The Royal Society. Recuperado el 1 de septiembre de 2022 a partir de <https://easac.eu/publications/details/tackling-antibacterial-resistance-in-europe/>
- ECDC (2007). European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) Recuperado el 1 de septiembre de 2022, a partir de <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>
- ECDC & WHO (2022). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2020 data
- EFSA (2022). Antimicrobial Resistance in the EU/EEA A One Health Response. Recuperado 9 de septiembre de 2022, a partir de <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/antimicrobial-resistance>
- Hamilton-Miller, J. M. T., & Shah, S. (2001). Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(1), 81-83. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00353-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00353-3)
- Hassenberg, K., Geyer, M., & Herppich, W. B. (2010). Effect of Acetic Acid Vapour on the Natural Microflora and Botrytis cinerea of Strawberries. *European Journal of Horticulture Science* 75(4), 1611-4426. <http://www.lfl.bayern.de/>
- Hölzel, C. S., Tetens, J. L., & Schwaiger, K. (2018). Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(11), 671. <https://doi.org/10.1089/FPD.2018.2501>
- Iovleva, A. & Doi, Y. (2017) Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clinics in Laboratory Medicine*, 37(2), 303-315. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005>
- Kempf, I., & Zeitouni, S. (2012). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences. *Pathologie Biologie*, 60(2), 9-14. <https://doi.org/10.1016/J.PATBIO.2009.10.013>
- Kuan, C. H., Rukayadi, Y., Ahmad, S. H., Wan Mohamed Radzi, C. W. J., Thung, T. Y., Premarathne, J. M. K. J. K., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Tan, C. W., Ramzi, O. B., Mohd Fadzil, S. N., Kuan, C. S., Yeo, S. K., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2017). Comparison of the microbiological quality and safety between conventional and organic vegetables sold in Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1433. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01433/XML/NLM>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology* 20 (5) 257-269 <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Léger, A., Lambraki, I., Graells, T., Cousins, M., Henriksson, P. J. G., Harbarth, S., Carson, C., Majowicz, S., Troell, M., Parmley, E. J., Jørgensen, P. S., & Wernli, D. (2021). AMR-Intervene: a social-ecological framework to capture the diversity of actions to tackle antimicrobial resistance from a One Health perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 1-21. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA394>
- Li, S., Ondon, B. S., Ho, S. H., Jiang, J., & Li, F. (2022). Antibiotic resistant bacteria and genes in wastewater treatment plants: From occurrence to treatment strategies. *Science of The Total Environment*, 838, 156544. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156544>
- Lucarelli, C., di Domenico, E. G., Toma, L., Bracco, D., Prignano, G., Fortunati, M., Pelagalli, L., Ensoli, F., Pezzotti, P., García-Fernández, A., Pantosti, A., & Inghrosso, L. (2017). *Ralstonia mannitolilytica* infections in an oncologic day ward: Description of a cluster among high-risk patients. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/S13756-017-0178-Z/FIGURES/2>
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules* 23(4), 795 <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>

- Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: Causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health* 2 article 145.. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>
- Mills, M. C., & Lee, J. (2019). The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environmental Pollution*, 255, 113143. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113143>
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., & Diez-Gonzalez, F. (2004). Preharvest Evaluation of Coliforms, Escherichia coli, Salmonella, and Escherichia coli O157:H7 in Organic and Conventional Produce Grown by Minnesota Farmers. *Journal of Food Protection*, 67(5), 894-900. [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/67/5/894/1671921/0362-028x-67\\_5\\_894.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/67/5/894/1671921/0362-028x-67_5_894.pdf)
- Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28, 19-28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)
- Niestępski, S., Harnisz, M., Korzeniewska, E., Aguilera-Arreola, M. G., Contreras-Rodríguez, A., Filipkowska, Z., & Osińska, A. (2019). The emergence of antimicrobial resistance in environmental strains of the *Bacteroides fragilis* group. *Environment International*, 124, 408-419. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.056>
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
- O'Neill Jim (2014). Review on Antimicrobial Resistance by order of the UK Prime Minister and Wellcome Trust. *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*
- Ortiz-Solà, J., Viñas, I., Colás-Medà, P., Anguera, M., & Abadias, M. (2020). Occurrence of selected viral and bacterial pathogens and microbiological quality of fresh and frozen strawberries sold in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 314, 108392. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108392>
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., Niestępski, S., & Konopka, I. (2020). Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 381, 121221. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121221>
- Österblad, M., Pensala, O., Peterzéns, M., Helenius, H., & Huovinen, P. (1999). Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(4), 503-509. <https://doi.org/10.1093/JAC/43.4.503>
- Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1597-1606. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS121>
- 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>
- Ríos, E., López, M. C., Rodríguez-Avial, I., Culebras, E., & Picazo, J. J. (2017). Detection of *Escherichia coli* ST131 clonal complex (ST705) and *Klebsiella pneumoniae* ST15 among faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Journal of Medical Microbiology*, 66(2), 169-174. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000399>
- Roberts, R. R., Hota, B., Ahmad, L., Scott, D., Foster, S. D., Abbasi, F., Schabowski, S., Kampe, L. M., Gr-Ciavarella, G., Supino, M., Naples, J., Cordell, R., Levy, S. B., & Weinstein, R. A. (2009). Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8), 1175-1184. <https://doi.org/10.1086/605630>



- Rodrigo, S., Galhardo, R. S., Hastings, P. J., & Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a Stress Response and the Regulation of Evolvability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 399-435. <https://doi.org/10.1080/10409230701648502>
- Roth, L., Simonne, A., House, L., & Ahn, S. (2018). Microbiological analysis of fresh produce sold at Florida farmers' markets. *Food Control*, 92, 444-449. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.05.030>
- Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezarez, B., Lozano, C., López, M., Chichón, G., Torres, C., & Sáenz, Y. (2021). Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 12626. <https://doi.org/10.3390/IJMS222312626>
- Soendjojo, Emiria (2012) "Is Local Produce Safer? Microbiological Quality of Fresh Lettuce and Spinach from Grocery Stores and Farmers' Markets," *The Journal of Purdue Undergraduate Research*: Vol. 2, Article 10. DOI: <https://doi.org/10.5703/jpur.02.1.09>
- Tango, C. N., Choi, N. J., Chung, M. S., & Oh, D. H. (2014). Bacteriological quality of vegetables from organic and conventional production in different areas of Korea. *Journal of Food Protection*, 77(8), 1411-1417. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-514>
- van Duijkeren, E., Wielders, C. C. H., Dierikx, C. M., van Hoek, A. H. A. M., Hengeveld, P., Veenman, C., Florijn, A., Lotterman, A., Smit, L. A. M., van Dissel, J. T., Maassen, C. B. M., & de Greeff, S. C. (2018). Long-term Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the General Population in The Netherlands. *Clinical Infectious Diseases* 66(9), 1368-1376. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1015>
- van Duin, D & Doi, Y. (2017) The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Virulence*, 8:4, 460-469, <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
- Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S., León-Chávez, B. A., Thompson-Bonilla, M. R., Guerrero-González, T., Gómez-Conde, E., Martínez-Fong, D., & González-Barrios, J. A. (2018). Characterization of Gene Families Encoding Beta-Lactamases of Gram-Negative Rods Isolated from Ready-to-Eat Vegetables in Mexico City. *High-Throughput*, 7(4), 36. <https://doi.org/10.3390/HT7040036>
- Walia, S., Rana, S. W., Maue, D., Rana, J., Kumar, A., & Walia, S. K. (2012). Prevalence of multiple antibiotic-resistant Gram-negative bacteria on bagged, ready-to-eat baby spinach. *Health Research*, 23:2, 108-118, <https://doi.org/10.1080/09603123.2012.708916>
- Xylia, P., Botsaris, G., Chrysargyris, A., Skandamis, P., & Tzortzakis, N. (2019). Variation of microbial load and biochemical activity of ready-to-eat salads in Cyprus as affected by vegetable type, season, and producer. *Food Microbiology*, 83, 200-210. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.05.013>
- Zhang, Y., Xu, S., Yang, Y., Chou, S. H., & He, J. (2022). A 'time bomb' in the human intestine—the multiple emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1231-1246. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15795>
- Zumbado Morales, R., Barquero Montero, A., & Hidalgo Mora, O. (2022). Resistencia a los antibióticos: Una Revisión Bibliográfica. *Revista Ciencia y Salud Integrando Conocimientos*, 6(3), 145-153. <https://doi.org/10.34192/cienciaysalud.v6i3.500>