



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT "MICROBIOLOGIA"

**ENTEROBACTERIS EN PRODUCTES
VEGETALS FRESCOS:
RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS**

Memòria presentada per **Maria Pilar Falomir Llorens** per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques per la Universitat de València, dirigida pels Drs. Daniel Gozalbo Flor i Hortensia Rico Vidal

Signat: Maria Pilar Falomir Llorens

València, 2015



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

El Dr. Daniel Gozalbo Flor, catedràtic del Departament de Microbiologia i Ecologia de la Universitat de València, i la Dra. Hortensia Rico Vidal, professora titular del Departament de Microbiologia i Ecologia de la Universitat de València, certifiquen que Maria Pilar Falomir Llorens ha realitzat sota la seva direcció la Tesi Doctoral titulada: **“ENTEROBACTERIS EN PRODUCTES VEGETALS FRESCOS: RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS”**, i autoritzen la lectura i defensa de la mateixa.

I per que així consti als efectes oportuns, signem la present en Burjassot, a 8 d'octubre de 2015.

Signat: Daniel Gozalbo Flor

Signat: Hortensia Rico Vidal



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

Daniel Gozalbo Flor, director del Departament de Microbiologia i Ecologia de la Universitat de València, certifica que la Tesi Doctoral titulada: **“ENTEROBACTERIS EN PRODUCTES VEGETALS FRESCOS: RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS”**, ha estat realitzada al Departament de Microbiologia de la Universitat de València per Maria Pilar Falomir Llorens.

I per que així consti als efectes oportuns, signe la present en Burjassot, a 8 d'octubre de 2015.

Signat: Daniel Gozalbo Flor

*“Quan surts per fer el viatge cap a Itaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d’aventures, ple de coneixences”*

*“Mes lluny, sempre molt mes lluny,
mes lluny del demà que ara ja s’acosta.
I quan creieu que arribeu, sapigueu trobar noves sendes”*

Constantin Kavafis

*A Dani, Laura, Daniel i Marc, i
als que ja no estan, els meus pares*

Agraïments

Vull expressar el meu agraïment als dos directors de la meua tesi doctoral, la Dra. Hortensia Rico i el Dr. Daniel Gozalbo, per la seua excel·lent tasca en la direcció del treball i la seua companyonia i amistat, que han fet possible i agradable la realització d'aquesta tesi.

També vull donar les gràcies a tots els meus companys, membres de la Unitat de Farmàcia del Departament de Microbiologia de la Universitat de València, per la seua col·laboració que ha fet més fàcil la realització d'aquest treball.

No vull oblidar-me del analista clínic Carlos Sebastià, per la seua i desinteressada ajuda en la identificació i els antibiogrames d'alguns dels aïllats obtinguts, i per la seua amistat.

ABREVIATURES

- ANAM:** Àcid N-acetilmuràmic
- AVE:** Anàlisi de vigilància electrònica
- BGBL:** “Brilliant Green Bile Lactose Broth”
- BLEEs:** Beta-lactamases d’espectre estés
- CDC:** “Centers for Disease Control and Prevention”
- CE:** Comissió Europea
- CEE:** Comunitat Econòmica Europea
- CLSI:** “Clinical and Laboratory Standards Institute”
- Cmàx:** Concentració màxima
- CMB:** Concentració mínima bactericida
- CMI:** Concentració mínima inhibidora
- CMI90:** Concentració mínima necessària per a inhibir el 90% de la població bacteriana
- COESANT:** Comitè Espanyol de l’Antibiograma
- DDD:** Dosi diària definida
- DHD:** Dosi diària definida per 1000 habitants i dia
- EARSS:** “European Antimicrobial Resistance Surveillance System”
- ECDE:** “European Centre for Disease Prevention and Control”
- EMA:** “European Medicines Agency”
- EMB:** Eosina, blau de metilè (medi de cultiu)
- EPINE:** Estudi de Prevalença de les Infeccions Nosocomials en Espanya
- ESAC:** “European Surveillance of Antimicrobial Consumption”
- EUCAST:** “European Committee on Antimicrobials Susceptibility Testing”
- FAO:** Organització de les Nacions Unides per l’Alimentació i l’Agricultura (“Food and Agriculture Organization of the United Nations”)
- IL:** Interleucina
- INSPEAR:** “International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance”
- IOS:** “International Organization for Standardization”
- IRAS:** Infeccions relacionades amb l’assistència sanitària
- IR₁₁:** Índex de resistència front als onze antibiòtics utilitzats
- IRR:** Índex relatiu de resistència

IS: Seqüència d'inserció

KPC: Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*

MAGRAMA: Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient

MENSURA: Mesa Espanyola per la Normalització de la Sensibilitat i Resistència als Antimicrobians

MYSTIC: "Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection"

NAG: N-acetilglucosamina

NCCLS: "National Committee for Clinical Laboratory Standards"

NDM-1: New Delhi metal·lo-beta-lactamasa 1

NHSN: "National Healthcare Safety Network"

NMP: Nombre més probable

OMG: Organismes modificats genèticament

OMS: Organització Mundial de la Salut

PABA: Àcid p-aminobenzoic

PBPs: Proteïnes fixadores de penicil·lina

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PROTEK: "Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin"

RedMIVA: Xarxa de vigilància microbiològica de la Comunitat Valenciana

SEIMC: Societat Espanyola de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica

SEQ: Societat Espanyola de Quimioteràpia

SIA: Sistema d'Informació Ambulatoria

SIDA: Síndrome d'Immunodeficiència Adquirida

UCI: Unitat de cuidats intensius

UE: Unió Europea

RESUM

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat la presència d'enterobacteris en productes vegetals frescos que poden consumir-se directament, sense tractaments que poden afectar a la viabilitat dels microorganismes presents en aquests vegetals. Com material d'estudi s'han seleccionat una sèrie de verdures i hortalisses que habitualment poden consumir-se crues (tomates, enciams, rúcula, canonges, etc.), adquirides en distints establiments de la ciutat de València i els seus voltants, ja que la zona de l'horta de València es caracteritza, a més de per la qualitat i quantitat de la producció hortícola, per l'ús de pràctiques agrícoles (com l'ús de fem com adob) que afavoreixen la contaminació dels vegetals amb bacteris d'origen animal. Hi ha que indicar també que l'estudi s'ha realitzat tant amb verdures i hortalisses cultivades de manera estàndard o convencional (no ecològica), com amb productes ecològics o orgànics, i també amb vegetals processats (rentats, tallats i envasats) llestos per consumir directament (quarta gamma). S'han analitzat un total de 230 mostres de distints grups de vegetals: (i) 90 mostres de productes vegetals frescos cultivats mitjançant tècniques habituals (estàndard o convencional), (ii) 50 mostres de vegetals orgànics cultivats mitjançant mètodes ecològics, (iii) 60 mostres de productes vegetals de quarta gamma (tallats, processats, empaquetats i comercialitzats llestos pel consum), i (iv) 30 mostres d'amanides preparades en cuina, amb distints ingredients, i servides al consumidor.

Els distints vegetals analitzats van ser: tomates de diferents tipus (pera i redona convencional i ecològica) (50 mostres), enciams de diferents tipus (romana, iceberg, ecològic romana, i fulles roges i iceberg de quarta gamma) (60 mostres), cogollos (10 mostres), rúcula (quarta gamma i ecològica) (30 mostres), carlota (estàndard i ecològica) (20 mostres), canonges (quarta gamma) (20 mostres), i cogombre (estàndard) (10 mostres). Les mostres van ser adquirides en distints establiments de la ciutat de València i els voltants, tant en supermercats, fruiteries, i tendes especialitzades en productes ecològics. Les mostres d'amanida es van obtenir de menjadors escolars de dos centres educatius (20 mostres) i d'establiments de menjar per emportar (10 mostres).

Els resultats que es van obtenir en quant al NMP de coliformes en les mostres analitzades indiquen que aproximadament un 60% de totes les mostres estan contaminades amb bacteris coliformes, sent aquest percentatge qualitatiu major en les amanides (90%) i els productes de quarta gamma (75% de mostres contaminades), seguit dels productes ecològics (54%) i dels productes vegetals estàndard (42%). Les mostres que van mostrar un major contingut o càrrega de coliformes (superior a 2.400 per gram) van ser també les

RESUM

amanides (27%) i els productes de quarta gamma (20%), seguits dels productes estàndard (12%) i dels ecològics (4%), sent la mitjà total del 14% (Taula 1 i Annex I).

En quant a les espècies identificades (195 aïllats totals), la major part correspon a bacteris coliformes (gèneres *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* i *Klebsiella*), amb un total de 142 aïllats (73%), mentre que la resta són altres espècies d'enterobacteris (*Pantoea*, *Serratia*, *Kluyvera*, *Hafnia* i *Leclercia*) amb 45 aïllats (23%), i també es van identificar algunes espècies Gram-negatives que no pertanyen a la família dels enterobacteris (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Flavimonas* i *Acinetobacter*) (8 aïllats, 4%). Els percentatges d'aïllats que pertanyen a aquests grups (coliformes, altres enterobacteris, i altres Gram-negatius no enterobacteris) van ser similars en les mostres vegetals estàndard (80,6%, 16,1% i 3,2%, respectivament, amb un total de 62 aïllats), vegetals de quarta gamma (74,6%, 15,8% i 9,5%, respectivament, amb un total de 63 aïllats), amanides (87,9%, 12,1% i 0%, respectivament, amb un total de 33 aïllats), mentre que en els productes ecològics el grup majoritari d'aïllats va correspondre als enterobacteris no coliformes (56,7%), sent els coliformes el 43,2% dels aïllats (amb un total de 37 aïllats).

L'espècie més freqüentment aïllada en totes les mostres és *Enterobacter cloacae*, majoritària en els vegetals estàndard (47%), de quarta gamma (46%) i amanides (39%), mentre que en els productes vegetals ecològics l'espècie més freqüent és *Pantoea agglomerans* (24%). A continuació, com espècies més freqüents trobem *Klebsiella oxytoca* (13% dels aïllats totals), *P. agglomerans* (8,7%), *Klebsiella pneumoniae* (5,6%), *Serratia marcescens* (6%), *Enterobacter sakazakii* (actualment *Cronobacter* spp.) (4,1%), *Kluyvera ascorbata* (3%), *Citrobacter freundii* (3%), *Enterobacter aerogenes* (2,5%), *Flavimonas oryzihabitans* (2,05), *Hafnia alvei* (2%), *Escherichia coli* (2%), *Enterobacter cancerogenus* (2%), *Enterobacter gergoviae* (1%), *Kluyvera cryocrescens* (1%), *Pseudomonas putida* (1%), *Serratia plymuthica* (1%), *Acinetobacter baumannii* (0,5%), *Escherichia vulneris* (0,5%), *Leclercia adecarboxylata* (0,5%), *Serratia rubidaea* (0,5%) i *Stenotrophomonas maltophilia* (0,5%).

En aquest estudi no s'han detectat bacteris patògens, com *E. coli* O157:H7 (encara que els quatre aïllats identificats com *E. coli* no es van caracteritzar a nivell de soca), *Salmonella* i *Shigella*. No obstant, la presència en els vegetals frescos, que són ingerits preferentment crus pel consumidor, de bacteris patògens oportunistes, presents com microbiota epifítica pròpia del vegetal, o com contaminants procedents del sòl o de fonts d'origen animal o humà, pot representar un risc potencial d'infecció pel consumidor, especialment si està immunodeprimit o debilitat.

Com conseqüència dels resultats exposats a l'apartat anterior, el segon objectiu d'aquesta tesi ha abordat la determinació de la presència de bacteris resistents als antibiòtics, que encara sent poc perillosos pel consumidor pel seu caràcter no patogen (o per la baixa càrrega microbiana dels vegetals), poden contribuir, una vegada ingerits, a la disseminació de les resistències entre la microbiota del consumidor, i per tant, en la comunitat.

Com antibiòtics elegits per detectar la presència de resistències s'han utilitzat onze agents quimioteràpics habitualment emprats en clínica pel tractament d'infeccions per bacteris Gram-negatius: ampicil·lina i amoxicil·lina/clavulànic (Augmentine) (dos antibiòtics del grup de les penicil·lines), ceftazidima i cefotaxima (cefalosporines de tercera generació), ciprofloxacino (agent del grup de les quinolones), estreptomycina i gentamicina (antibiòtics aminoglicosídics), cloramfenicol, nitrofurantoïna, clotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim) i tetraciclina. Aquest grup d'antibiòtics abasta molècules molt distintes entre sí, que pertanyen als principals grups d'antimicrobians efectius front a bacteris Gram-negatius, amb mecanismes d'acció molt variats i front als quals els bacteris poden desenvolupar també distints mecanismes de resistència.

Del total d'aïllats (n: 195), la majoria (74,8%) presenten resistència a l'ampicil·lina i també un percentatge alt són resistents a l'Augmentine (67,7%); les resistències a nitrofurantoïna són el 12,8%, a tetraciclina el 6,6% i a cefotaxima el 3,6%; les resistències a estreptomycina, clotrimoxazol, gentamicina, ceftazidima i cloramfenicol, són més baixes i estan al voltant del 1%. Cal destacar que cap aïllat va presentar resistència a ciprofloxacino.

Si fem referència a les multiresistències que presenten el total d'aïllats (n: 195), trobem que un 11,3% no presenten cap resistència. Presenten una única resistència el 29,2%, dos resistències el 43,6%, tres resistències el 9,2%, quatre resistències el 5,6% i el 1% són resistents a cinc antibiòtics. També cal ressaltar que del percentatge d'aïllats que presenten dos resistències, el 96,5% presenten resistència conjunta a ampicil·lina i a Augmentine, donat que són penicil·lines àmpliament usades i que els bacteris posseeixen mecanismes de resistència similars front a aquests antibiòtics. Cal destacar també que la majoria d'aïllats són resistents a antibiòtics àmpliament usats en clínica, tal com els beta-lactàmics amoxicil·lina/clavulànic i ampicil·lina, mentre que les resistències a cefalosporines de tercera generació (cefotaxima i ceftazidima), que han sigut usades d'una manera molt més limitada, són infreqüents. El nostre estudi és el primer que descriu la presència de resistències a antibiòtics clínicament rellevants en enterobacteris presents en productes

RESUM

vegetals frescos en Espanya, particularment en la fèrtil àrea de València, coneguda per la seva producció agrícola.

Els aliments vegetals frescos poden estar implicats en la transmissió d'espècies enteropatogèniques amb resistències. Varis factors expliquen aquest fenomen: (i) l'ús a escala industrial d'antibiòtics en ramaderia per a millorar la producció animal és molt important quantitativament, i (ii) l'ús de fem com adob agrícola, o el d'aigües contaminades amb matèria d'origen fecal com reg en plantacions agrícoles.

D'altra banda, els nostres resultats recolzen la idea de que la contaminació microbiana dels vegetals frescos amb patògens oportunistes tal com *E. cloacae* i *K. pneumoniae*, entre altres espècies, deu ser considerada com un problema de seguretat alimentària, especialment en persones debilitades o immunocompromeses per diferents causes, i també de que els productes vegetals frescos participen com a portadors de bacteris amb resistències des de les granges als consumidors. La presència de resistències a antibiòtics i particularment les multiresistències en espècies d'*Enterobacter* i *Klebsiella* i altres gèneres (*Serratia*, *Pantoea*, *Kluyvera*, *Flavimonas*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia* i *Pseudomonas*) en productes vegetals frescos recolza la seva utilitat per a servir com (i) indicadors de la disseminació de les resistències en el medi ambient, així com (ii) portadors de determinants de resistència des de les granges als consumidors, cosa que probablement contribueix a la disseminació de resistències a la microbiota comensal i/o patogènica a través de mecanismes de transferència horitzontal de gens. Aquesta qüestió hauria de ser considerada com un problema "silenciós" de seguretat alimentària, ja que en la majoria de casos no afecta directament a la salut del consumidor (no causa malaltia o símptomes) però pot contribuir al problema creixent de les resistències als antibiòtics en bacteris Gram-negatius. A més, els nostres resultats posen de manifest que seria molt útil incloure els productes vegetals frescos dintre de programes de vigilància epidemiològica per analitzar la disseminació de resistències bacterianes en el medi ambient i en la comunitat, fora de l'entorn hospitalari.

ÍNDEX

ÍNDIX GENERAL

1. INTRODUCCIÓ	1
<i>1.1. ANTIBIÒTICS</i>	3
1.1.1. Antibiograma	4
1.1.2. Mecanismes de resistència bacteriana als antibiòtics	8
1.1.3. Principals grups de quimioteràpics antibacterians:	
Mecanisme d'acció, espectre i resistències	21
1.1.3.1. Antibacterians beta-lactàmics	22
1.1.3.2. Antibacterians quinolònics	37
1.1.3.3. Antibacterians macròlids	40
1.1.3.4. Lincosamides (lincosànids)	44
1.1.3.5. Cloramfenicol	45
1.1.3.6. Tetraciclines	45
1.1.3.7. Aminoglucòsids	48
1.1.3.8. Antibiòtics peptídics	50
1.1.3.9. Oxazolidinones	53
1.1.3.10. Nitroderivats	54
1.1.3.11. Sulfamides i diaminopirimidines	55
1.1.3.12. Altres quimioteràpics antimicrobians	57
<i>1.2. ENTEROBACTERIS I PRODUCTES VEGETALS FRESCOS</i>	59
1.2.1. Enterobacteris i microorganismes coliformes	59
1.2.2. Enteropatògens en productes vegetals frescos:	
implicacions en seguretat alimentària	60
1.2.3. Adaptació dels bacteris enteropatògens al medi vegetal	62
1.2.4. Agricultura ecològica	65
1.2.5. Resistències als antibiòtics en la comunitat	67
1.2.6. Els vegetals frescos com vehicles de transmissió de resistències	71
1.2.7. Infecció nosocomial i resistències als antibiòtics	72
1.2.8. Sistemes de vigilància de la resistència	81
1.2.9. Xarxa de vigilància microbiològica de la Comunitat Valenciana (RedMIVA)	84
2. OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL	87
<i>2.1. OBJECTIUS</i>	89
<i>2.2. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL</i>	89

3. RESULTATS	93
<i>3.1. TREBALLS COMPENDIATS I APORTACIÓ</i>	95
<i>3.2. PUBLICACIÓ 1</i>	101
<i>3.3. PUBLICACIÓ 2</i>	109
<i>3.4. PUBLICACIÓ 3</i>	119
<i>3.5. PUBLICACIÓ 4</i>	129
<i>3.6. PUBLICACIÓ 5</i>	137
<i>3.7. PUBLICACIÓ 6</i>	145
<i>3.8. PUBLICACIÓ 7</i>	159
<i>3.9. ANNEX I</i>	167
<i>3.10. ANNEX II</i>	177
<i>3.11. ANNEX III</i>	187
<i>3.12. ANNEX IV</i>	199
4. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ	211
<i>4.1. ENTEROBACTERIS EN PRODUCTE VEGETALS FRESCOS</i>	213
<i>4.2. RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS EN ELS AÏLLATS IDENTIFICATS</i>	227
5. CONCLUSIONS	243
6. BIBLIOGRAFIA	247

1. INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

D'acord amb l'objectiu general d'aquesta tesi doctoral (determinació de bacteris coliformes i aïllament d'enterobacteris en mostres de verdures i hortalisses, la seva identificació a nivell d'espècie i l'estudi de la presència de resistències a distints quimioteràpics antibacterians en les soques aïllades), que es descriu i justifica en l'apartat corresponent d'aquesta tesi, la introducció s'ha dividit en dos parts ben definides. La primera part on es descriuen els principals grups de agents quimioteràpics antibacterians, fent especial remarca en els mecanismes de resistència (que òbviament estan relacionats amb el mecanisme d'acció), de transmissió de la resistència i en els mètodes de determinació *in vitro* de les resistències. En la segona part de la introducció s'aborda el tema de la presència d'enterobacteris en els productes vegetals frescos i les seues resistències als antibiòtics, així com en les fonts de contaminació, i la potencial repercussió per al consumidor i també en la infecció nosomial.

1.1. ANTIBIÒTICS

Els agents quimioteràpics antimicrobians (antibiòtics o de síntesi) tenen com objecte principal la curació dels processos infecciosos en els pacients, i la seva introducció terapèutica va suposar una fita en la lluita contra les malalties infeccioses, així com un avanç espectacular en la medicina, ja que han permès abordar tractaments quirúrgics i tractaments en pacients immunodeprimits, impensables abans de l'era antibiòtica. A diferència d'altres fàrmacs, l'ús d'antibiòtics transcendís de l'individu a la col·lectivitat, donat el caràcter infeccios de les malalties causades pels microorganismes. No obstant, l'èxit derivat de la utilització dels antibiòtics no està actualment garantit. La utilització massiva d'aquests compostos en medicina humana, veterinària i inclòs en l'àmbit agrícola ha provocat que els microorganismes hagin desenvolupat múltiples i eficaços mecanismes de resistència als antibiòtics, el que representa en l'actualitat un greu problema clínic ja que s'està incrementant el nombre d'infeccions causades per microorganismes multiresistents, i per tant de difícil tractament. Aquest problema en els últims anys està estenent-se des de l'àmbit hospitalari al comunitari. La necessitat de noves molècules antibiòtiques és necessària per combatre les resistències dels microorganismes als antibiòtics actuals, i açò representa un repte molt important pel futur de la societat. En aquesta introducció es descriuran els mètodes utilitzats per la determinació de les resistències *in vitro*, així com els principals processos de transmissió de les resistències als

INTRODUCCIÓ

antibiòtics entre bacteris, i les característiques dels principals grups de quimioteràpics antibacterians.

1.1.1. ANTIBIOGRAMA

Els microorganismes que integren una espècie bacteriana no solen presentar un comportament homogeni quan s'exposen a l'acció dels diferents antimicrobians, ja que poden presentar mecanismes de resistència. Aquesta resposta pot mesurar-se en el laboratori i rep el nom d'antibiograma o estudi de sensibilitat. Encara que existeixen diversos mètodes, la majoria d'ells es fonamenten en l'enfrontament de diferents concentracions d'antibiòtic a un inòcul bacterià estàndard i persegueixen la determinació del valor de la concentració mínima inhibidora (CMI).

La CMI es defineix com la concentració mínima d'antimicrobià que inhibeix el creixement bacterià. Aquest valor es pren com a referència en l'estudi de sensibilitat, i representa l'activitat bacteriostàtica o capacitat del antimicrobià per a inhibir el creixement bacterià. Aquesta inhibició sol ser reversible, ja que el microorganisme o la població bacteriana poden continuar el seu creixement després de l'eliminació de l'antibiòtic del medi. En els pacients, el sistema immunològic contribueix a la curació del procés infecciós.

El terme bactericida està reservat per aquells antibiòtics que, a més d'inhibir el creixement bacterià, produeixen la mort cel·lular. Aquesta acció és irreversible. El coneixement de l'activitat bactericida requereix la determinació de la CMB (concentració mínima bactericida), que es defineix com la concentració mínima d'antimicrobià capaç de matar el 99,9% de la població bacteriana. Tant la CMI com la CMB s'expressen en termes quantitativus ($\mu\text{g/mL}$ o mg/L).

Teòricament, es prefereixen els antimicrobians bactericides als bacteriostàtics, encara que en la pràctica l'èxit que es deriva de la seva utilització es similar, ja que en condicions normals, el sistema immunològic completa l'actuació dels antibiòtics bacteriostàtics. Tanmateix, en els pacients immunocompromesos es recomana utilitzar preferentment antibiòtics bactericides, ja que el sistema immunològic no contribueix a l'eliminació de l'agent infecciós.

La diferència entre antibiòtics bacteriostàtics i bactericides no sempre és fàcil, ja que depèn de la concentració de l'antimicrobià utilitzat i de l'espècie bacteriana. En general, l'efecte bactericida augmenta al incrementar la concentració de l'antimicrobià.

En algunes ocasions es produeixen fenòmens de tolerància, pels quals un antibiòtic bactericida es comporta com bacteriostàtic. Un exemple d'això és la tolerància que

presenten algunes soques de *Staphylococcus aureus* o de *Streptococcus pneumoniae* als antibiòtics beta-lactàmics degut a l'ineficàcia dels sistemes d'autòlisi i que fa que fracassi el tractament amb aquests antimicrobians.

D'altra banda, un efecte bactericida molt ràpid no sempre és beneficiós, ja que pot donar lloc a un alliberament massiu d'endotoxines després de la mort cel·lular que afavoreix l'alliberament de mediadors de la resposta inflamatòria i agreuja més encara la situació clínica del pacient.

L'estudi de la sensibilitat a un antimicrobià es pot realitzar per mitjà de diferents tècniques (Bauer *et al.*, 1966; Willey *et al.*, 2009; CLSI, 2010; Cantón *et al.*, 2011):

a) Mètodes fenotípics o antibiograma: són els més utilitzats. Es basen en enfrontar un inòcul bacterià a diferents concentracions d'antimicrobians. Els resultats obtinguts ens permetran classificar al microorganisme com sensible, intermedi o resistent a cada antimicrobià. Hi han dos tipus de tècniques fenotípiques (Navarro *et al.*, 2010, 2011) :

Tècniques de dilució: proporcionen resultats quantitius, ja que determinen la CMI, que és defineix com la dilució més baixa d'antimicrobià a la que no s'observa creixement bacterià. Es poden realitzar en medi líquid (dilució en caldo) o en medi sòlid (dilució en agar) on s'han dissolt prèviament concentracions creixents d'un antimicrobià. En ambdós casos el medi de referència és el de Mueller-Hinton.

Tècniques de difusió: proporcionen resultats qualitius. S'utilitzen discos de paper impregnats amb una solució estandarditzada d'antibiòtic que es disposa sobre la superfície d'un medi sòlid, on prèviament s'ha inoculat una suspensió bacteriana. Després d'un període d'incubació, el fàrmac difondrà per l'agar al voltant del disc generant un graó de concentració, i apareixerà, o no, un halo d'inhibició del creixement bacterià. El diàmetre de l'halo es relaciona amb el grau de sensibilitat del microorganisme (CMI): quan major sigui aquest diàmetre, major serà la sensibilitat que presenta el bacteri front a l'antibiòtic. A banda d'aquesta, una altra tècnica de difusió és l'Epsilon test, que permet determinar de manera directa la CMI. Fa servir una tira de plàstic impregnada d'antibiòtic en concentracions decreixents que estan indicades en la superfície d'aquesta. Al entrar en contacte la tira amb l'agar inoculat amb el microorganisme, es forma un halo d'inhibició en forma d'el·lipse. La CMI correspon al valor de la concentració del antimicrobià en el punt de tall de la tira amb l'el·lipse. Les tècniques de dilució i les de difusió són comparables entre elles ja que hi ha una correlació lineal entre el diàmetre de l'halo d'inhibició d'un disc i la CMI.

INTRODUCCIÓ

- b) Mètodes bioquímics: consisteixen en la determinació del mecanisme pel qual el bacteri és resistent a un antimicrobià.
- c) Mètodes genètics: detecten els gens de resistència. Generalment mitjançant tècniques de PCR.

L'antibiograma té per objecte avaluar *in vitro* la resposta d'un microorganisme a un o més antibiòtics, i obtenir un resultat inicial predictiu de la seva eficàcia clínica. Les proves de sensibilitat (difusió en agar i/o càlcul de la CMI) comencen a generalitzar-se a partir de la dècada dels anys 60. Posteriorment (dècades dels 70 i 80) s'identifiquen les variables que afecten als resultats i es desenvolupen les normes per assegurar la seva reproductibilitat. Paral·lelament van començar a plantejar-se els criteris que deuen regir la interpretació de resultats per correlacionar la CMI amb l'èxit o fracàs terapèutic. Amb aquesta finalitat es crearen diferents comitès nacionals, entre els que està el grup espanyol MENSURA (*Mesa Española para la Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos*), constituït en 1991 per la SEQ (*Sociedad Española de Quimioterapia*) i la SEIMC (*Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*). Malgrat que els distints comitès utilitzaven criteris i dades similars, els punts de tall definits eren molt dispers, pel que es va fer necessari arribar a un consens per unificar els valors. Més recentment, en l'última dècada, els grups americans i europeus (CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute* en Estats Units; EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), han harmonitzat els avanços realitzats en el coneixement dels fenòmens de resistència i de la farmacodinàmia amb la fi d'establir els punts de tall que diferencien les categories clíniques de tractament (sensible, intermedi i resistent). Malgrat els importants avanços realitzats, especialment en Europa, les diferències persisteixen. En l'any 2006, l'IOS (*International Organization for Standardization*) va definir les categories amb la fi d'evitar confusions, definint-les com s'indica a continuació, en funció de la probabilitat de l'èxit o fracàs terapèutic (Navarro *et al.*, 2010; Soriano, 2010; Cantón *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2011):

Sensible: quan un aïllat bacterià és inhibit *in vitro* per una concentració d'un antimicrobià que s'associa a una alta probabilitat amb l'èxit terapèutic.

Intermedi: quan un aïllat bacterià és inhibit *in vitro* per una concentració d'un antimicrobià que s'associa a un efecte terapèutic incert.

Resistent: quan un aïllat bacterià és inhibit *in vitro* per una concentració d'un antimicrobià que s'associa a una alta probabilitat de fracàs terapèutic.

Entre el CLSI i l'EUCAST hi han aspectes organitzatius i conceptuals que els diferencien, però són els punts de tall de l'EUCAST els que estan recomanats per la *European Medicines Agency* (EMA) i pel *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) per establir la resistència o sensibilitat dels aïllats microbians. A més, amb el temps molts comitès nacionals de l'antibiograma han harmonitzat els seus criteris d'actuació amb els de l'EUCAST, i entre ells es troba el *Comité Español del Antibiograma* (COESANT). Els punts de tall establerts per l'EUCAST són d'especial interès en la vigilància epidemiològica, ja que permeten discriminar entre poblacions microbianes que no tenen o no expressen mecanismes de resistència, d'aquelles que els presenten i expressen (Cantón *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2010; Soriano, 2010; Martínez-Martínez *et al.*, 2013).

No sempre es imprescindible conèixer el valor de la CMI per l'elecció de l'antimicrobià, encara que el seu estudi es recomana per avaluar, des del punt de vista epidemiològic, canvis en el comportament dels microorganismes front als antimicrobians. En aquest sentit, fins ara no s'han descrit soques de *Streptococcus pyogenes* amb resistència a la penicil·lina i, per tant, no seria necessari determinar sistemàticament la sensibilitat d'aquest bacteri a l'acció d'aquest antimicrobià. Pel contrari, la sensibilitat de *S. pneumoniae* a la penicil·lina o a l'eritromicina, o la de *Haemophilus influenzae* a l'amoxicil·lina, varia de manera important d'un país a altre, per això es recomana el seu estudi rutinari, amb la fi d'adequar les opcions terapèutiques.

La determinació del valor de la CMI o l'estudi mitjançant mètodes de difusió també permeten diferenciar microbiològicament les poblacions bacterianes sensibles de les resistents. Els bacteris sensibles s'inhibeixen per concentracions baixes d'antimicrobià (presència d'halos d'inhibició) i no tenen mecanismes pels quals els bacteris resisteixen a l'acció dels antimicrobians. Pel contrari, la presència d'un mecanisme de resistència determina un augment de la concentració necessària per inhibir o suprimir el creixement bacterià. Aquestes definicions no deuen confondre's amb les categories clíniques de sensible, intermedi i resistent amb les que s'informen els resultats de l'antibiograma a partir dels valors de CMI o dels halos d'inhibició. Les categories clíniques es defineixen utilitzant no sol conceptes microbiològics, sinó també criteris farmacològics i clínics.

Les definicions per a cadascuna de les categories les estableixen distints comitès d'experts en l'àmbit internacional, com són el CLSI en Estats Units o EUCAST en Europa (McKinnon & Davis, 2005; Cantón *et al.*, 2006b, 2007; Amsden *et al.*, 2010; Mandell *et al.*, 2010; Moellering & Heliopoulos, 2010; Cantón *et al.*, 2011).

INTRODUCCIÓ

1. Definició de sensible, intermedi i resistent utilitzant criteris microbiològics:

Sensible: El microorganisme no té mecanismes de resistència i s'inhibeix amb concentracions baixes d'antimicrobià.

Intermedi: El microorganisme presenta mecanismes de resistència de baix nivell d'expressió i s'inhibeix amb concentracions d'antimicrobià un poc més elevades que les sensibles.

Resistent: El microorganisme té mecanismes de resistència d'alt nivell d'expressió i es necessiten concentracions molt elevades per inhibir el seu creixement.

2. Definició de sensible, intermedi i resistent utilitzant criteris farmacològics:

Sensible: El valor de la CMI és inferior a la concentració màxima (C_{màx}) que s'assolis amb un tractament estàndard.

Intermedi: El valor de la CMI sols es superat per la C_{màx} augmentant la dosi i/o reduint el temps entre dosi.

Resistent: El valor de la CMI és superior a la C_{màx} que s'assolis amb el tractament estàndard.

3. Definició de sensible, intermedi i resistent utilitzant criteris clínics:

Sensible: Els resultats clínics han mostrat una elevada probabilitat d'èxit terapèutic pels valors de la CMI obtinguts en l'estudi de sensibilitat *in vitro*; per tant el pacient infectat amb el microorganisme estudiat pot ser tractat amb l'antimicrobià considerat, seguint un esquema estàndard.

Intermedi: Sols es pot obtenir èxit terapèutic augmentant la dosi i/o reduint el temps entre dosi.

Resistent: Els resultats clínics han mostrat una elevada probabilitat de fracàs terapèutic pels valors de la CMI obtinguts en l'estudi de sensibilitat *in vitro*; per tant el pacient infectat amb el microorganisme estudiat no deu ser tractat amb l'antimicrobià considerat.

1.1.2. MECANISMES DE RESISTÈNCIA BACTERIANA ALS ANTIBIÒTICS

Les resistències que presenten els microorganismes poden ser de dos tipus:

- a) Resistència intrínseca: de manera natural el bacteri és resistent a un determinat fàrmac per posseir característiques especials en la seva estructura, que impedeixen l'acció del principi actiu. Per exemple, la falta de paret cel·lular del gènere *Mycoplasma* li confereix resistència intrínseca als antibiòtics beta-lactàmics, que concentren la seva acció en la paret bacteriana. També pot ser deguda a la dificultat de l'antibiòtic per aplegar a la

seva diana, per exemple, molts bacteris Gram-negatius són resistents a algunes penicil·lines degut a que la membrana externa bacteriana és impermeable a l'antibiòtic (Daza Perez, 1998; Cantón *et al.*, 2006a, 2006b, 2011; Murray *et al.*, 2014).

b) Resistència adquirida: per mecanismes adaptatius, certs individus d'una població bacteriana en principi sensible a un antibiòtic, acaben sent resistents al mateix, el que dona lloc a creixement microbià en presència del fàrmac (Craig & Ebert, 1990; Drusano, 2004; Rybak, 2004; Cantón *et al.*, 2006a, 2006b; Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Moellering & Heliopoulos, 2010; Cantón *et al.*, 2011; Nogueira, 2011; Giedraitiene *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014).

Els bacteris resistents sorgeixen per un procés de selecció adaptatiu baix l'acció del propi antimicrobià. En qualsevol població bacteriana existeixen de manera natural cèl·lules bacterianes que no s'inhibeixen per concentracions que habitualment inhibeixen la majoria dels microorganismes que pertanyen a aquesta població. Aquestes cèl·lules s'anomenen mutants resistents. Quan es sotmet una població bacteriana que conté mutants resistents a l'acció inhibidora de l'antibiòtic pot produir-se un efecte deleteri de la subpoblació sensible, mentre que la subpoblació resistent pot continuar el seu desenvolupament, arribant a substituir a tota la població bacteriana (procés de selecció) (Craig & Ebert, 1990; Gullberg *et al.*, 2011). En condicions habituals (dosi, pauta i temps de tractament adequats) els processos de selecció no es manifesten o tenen escassa transcendència clínica. Tanmateix, l'abús en l'ús dels agents antimicrobians i la mala utilització durant anys ha originat una forta pressió selectiva en el món microbià, i això afavoreix l'increment de les poblacions resistents. La persistència de les poblacions resistents en un procés infecció s'associa amb el fracàs terapèutic.

Els processos de selecció i emergència de les poblacions resistents poden evitar-se atenent a:

a) L'antibiòtic utilitzat: es deuen elegir antibiòtics pels quals les poblacions bacterianes presenten escàs nombre de mutants resistents.

b) La dosi usada: les dosis elevades d'antibiòtics persegueixen aconseguir concentracions d'antibiòtic en el lloc de la infecció que inclòs puguin eliminar els mutants resistents.

c) L'associació d'antimicrobians: la probabilitat de seleccionar mutants resistents a dos antibiòtics diferents és molt baixa.

La resistència a antimicrobians també pot produir-se per intercanvi de material genètic (gens de resistència) responsable de la resistència als antibiòtics en les diferents poblacions

INTRODUCCIÓ

bacterianes. Els bacteris resistents que hagin adquirit gens de resistència i que els expressen correctament poden seleccionar-se durant el tractament antimicrobià.

La resistència és un fenomen amb transcendència més enllà de l'individu al que s'administra un antimicrobià i constitueix un problema de salut pública. La selecció de bacteris resistents té un impacte negatiu sobre el pacient infectat, perquè condueix amb una probabilitat elevada al fracàs terapèutic. Així mateix, es rellevant per la resta dels individus o col·lectivitat, ja que augmenten les possibilitats d'adquirir i desenvolupar infeccions per bacteris amb resistència als antimicrobians. En aquest sentit, per exemple, una àmplia utilització de fluoroquinolones, no sol en l'àmbit humà sinó també en el veterinari, s'ha associat amb un augment important d'aïllats d'*Escherichia coli* amb resistència a aquest grup de fàrmacs (al voltant del 35% d'aïllats resistents), que limita la seva utilització en les infeccions urinàries.

Existeixen diferents mecanismes pels que un bacteri és capaç de resistir l'acció inhibitoria o letal dels antimicrobians (Fig. 1.1; Taula 1.1). Malgrat la complexitat que representen aquests mecanismes i les conseqüències que porten, tots ells poden estructurar-se en cinc categories. Cadascun pot afectar de manera diferent a les distintes classes d'antimicrobians i tenir una importància epidemiològica distinta. El seu coneixement és decisiu en l'elaboració i el disseny de les guies de tractament antimicrobià (Cantón *et al.*, 2006a, 2006b, 2011).

Per a que un antimicrobià exerceixca el seu efecte és necessari que arribi a la seva diana d'actuació, que interaccioni amb aquesta i que inhibeixca eficaçment la seva funció. La resistència als antimicrobians es pot produir per:

- a) Dificultat en l'accés de l'antimicrobià a la seva diana.
- b) Eliminació o expulsió de l'antibiòtic per evitar que assolisca concentracions efectives.
- c) Inactivació o modificació de l'estructura química de l'antimicrobià.
- d) Modificació o hiperproducció de la diana.
- e) Desenvolupament de rutes metabòliques que suplisquen l'inhibida per l'antibiòtic.

És habitual que en un mateix microorganisme coexisteixquen més d'un d'aquests mecanismes, amb el que augmenta el nombre d'antimicrobians als que és resistent el microorganisme. La disseminació d'aquests mecanismes entre els bacteris patògens ha sigut extraordinàriament ràpida i en l'actualitat cap antimicrobià escapa a l'acció d'algun d'aquests mecanismes.

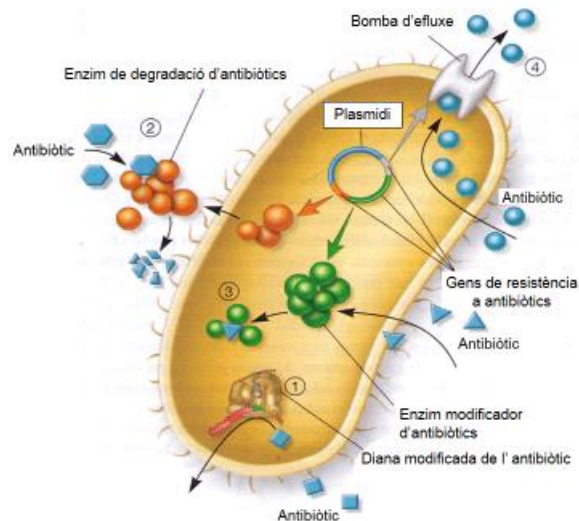


Fig.1.1. Esquema de la cèl·lula bacteriana i els principals mecanismes de resistència adquirida als antibiòtics (modificat de Willey *et al.*, 2009). (No s'han inclòs la impermeabilitat a l'antibiòtic, ni el desenvolupament de rutes metabòliques alternatives).

a) Dificultat en l'accés de l'antimicrobià a la seva diana

La membrana plasmàtica bacteriana representa una barrera natural per l'entrada de l'antimicrobià. Durant el tractament antimicrobià poden seleccionar-se mutants amb alteracions en la permeabilitat. Quan aquest fet es produeix sol expressar-se un baix nivell de resistència, però amb afectació d'antimicrobians no relacionats entre sí. Encara que la majoria dels problemes de permeabilitat es deuen a mutacions en gens cromosòmics, s'ha demostrat que els determinants genètics de resistència al cloramfenicol i a les tetraciclins per modificació en el transport poden estar codificats en elements transferibles. També, mitjançant una disminució de la permeabilitat al fàrmac per modificació dels lipopolisacàrids i/o les porines de la membrana externa dels bacteris Gram-negatius, aquests poden presentar resistència a les quinolones i als antibiòtics beta-lactàmics, respectivament (Cuéllar, 1996, 2006, 2011; Redgrave *et al.*, 2014).

b) Eliminació o expulsió de l'antibiòtic per evitar que assolisca concentracions efectives

S'ha descrit que la hiperexpressió de varis sistemes d'expulsió o bombeig pot produir resistència a distints antimicrobians (resistència pleiotròpica), entre ells, els beta-lactàmics,

INTRODUCCIÓ

les quinolones, les tetraciclines, els macròlids i els compostos relacionats, així com el cloramfenicol. Aquests sistemes també poden afectar a antisèptics com els amonis quaternaris i a alguns desinfectants. Per aquest motiu es pot produir selecció de resistència a diferents antibiòtics quan s'utilitzen altres compostos (Li & Nikaido, 2009; Cantón *et al.*, 2006b, 2011).

Taula 1.1. Mecanismes de resistència bacteriana als antibiòtics (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

Mecanisme de resistència	Antibiòtic (exemple)	Base genètica de la resistència	Mecanisme present en:
Permeabilitat reduïda	Penicil·lines	Cromosomal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacteris
Inactivació de l'antibiòtic (penicil·linases, metilases, acetilases, fosforilases)	Penicil·lines	Plasmídica Cromosomal	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterobacteris <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Modificació de la diana (ARN polimerasa, ribosoma, ADN girasa)	Cloramfenicol	Plasmídica Cromosomal	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterobacteris
	Aminoglucòsids	Plasmídica	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Eritromicina	Cromosomal	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Rifamicina		Enterobacteris
Modificació de ruta bioquímica Eflux (bombes d'expulsió)	Estreptomicina		Enterobacteris
	Norfloxacino (quinolona)		Enterobacteris
	Sulfamides	Cromosomal	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterobacteris
	Tetraciclina	Plasmídica	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterobacteris
	Cloramfenicol	Cromosomal	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
	Eritromicina	Cromosomal	<i>Staphylococcus spp.</i>

En condicions normals i absència d'antibiòtics, els sistemes d'expulsió tenen una funció fisiològica d'eliminació de substàncies metabòliques del bacteri. Solen estar codificats per determinants genètics localitzats en el cromosoma bacterià, encara que també s'han associat a plasmidis. En els bacteris Gram-negatius, la coexistència d'alteracions en les porines d'entrada amb un sistema eficaç d'expulsió eleva notablement els nivells de resistència als antimicrobians. Aquesta circumstància és típica d'alguns microorganismes amb un ampli perfil de multiresistència, entre els que s'inclou *Pseudomonas aeruginosa* i altres (*Burkholderia cepacia* i *Stenotrophomonas maltophilia*). El model de bomba d'expulsió més conegut és el que determina l'operó *mexAB-oprM* de *Ps. aeruginosa*. Aquest sistema participa en el transport a l'exterior de la pioverdina i confereix resistència a les tetraciclins, el cloramfenicol, les fluoroquinolones i a alguns beta-lactàmics. En bacteris Gram-positius, com *S. aureus*, també existeixen sistemes d'expulsió (NorA). Tots els sistemes de bombeig presenten complexos sistemes de regulació que responen davant estímuls externs, com la presència d'antibiòtics.

Donada la rellevància dels mecanismes d'expulsió, alguns compostos (cetòlids i gliciliciclins) han centrat part del seu desenvolupament en evitar que siguin afectats per les bombes d'expulsió. Exemple de això és el desenvolupament de la telitromicina (cetòlids) o la tigeciclina (gliciliciclins). També s'estan desenvolupant inhibidors específics dels sistemes de bombeig, encara que aquests no han sigut introduïts en terapèutica (Li & Nikaido, 2009).

c) Inactivació o modificació de l'estructura química de l'antimicrobià

Els mecanismes de resistència enzimàtics solen ser molt específics; hidrolitzen o modifiquen l'estructura química d'una sola família d'antibiòtics o inclòs d'un únic antibiòtic (Tenover, 2001, 2006; Cantón *et al.*, 2006b, 2011; Cuéllar, 2011). Els diferents enzims que confereixen resistència poden ser:

- (i) Hidrolases. Entre elles destaquen les beta-lactamases que hidrolitzen l'enllaç amida de l'anell beta-lactàmic, i les esterases que obrin l'anell lactònic de l'eritromicina. Aquests enzims estan àmpliament difosos entre els bacteris patògens i comprometen en nombroses ocasions el tractament antimicrobià. Per alguns d'aquests enzims existeixen inhibidors específics, com l'àcid clavulànic, el sulbactam o el tazobactam que, associats als beta-lactàmics (essencialment penicil·lines), recuperen l'activitat d'aquests últims (Bush, 1989; Cantón *et al.*, 2002; Bush & Jacoby, 2010; Cantón *et al.*, 2012; Berrazeg *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓ

- (ii) Fosfotransferases. Participen en la transferència de grups fosfat des de l'ATP bacterià als radicals hidròxils dels aminoglicòsids. També afecten als macròlids i la rifampicina.
- (iii) Adeniltransferases. Transfereixen grups adenil des de l'ATP als radicals hidròxils dels aminoglicòsids i les lincosamides.
- (iv) Acetilases. Transfereixen grups acetil del acetil-CoA sobre grups amino en els aminoglicòsids o grups hidròxils en el cloramfenicol.

El nivell de resistència que confereixen aquests enzims és variable i depèn de l'afinitat de l'enzim pel substrat, de la seva cinètica d'actuació i de la quantitat d'enzim produït. Aquest últim guarda relació amb l'hiperexpressió de gens reguladors (mecanisme d'inducció), les mutacions en aquests gens, la inserció de promotors genètics potents que incrementen l'expressió del gen, o l'augment del nombre de còpies del gen que codifica l'enzim. Aquests processos són típics dels antibiòtics beta-lactàmics.

Els determinants genètics són de naturalesa cromosòmica i plasmídica i, amb relativa freqüència, s'associen a elements de transposició (transposons). Per això, alguns d'aquests enzims estan molt difosos entre els microorganismes patògens, particularment les beta-lactamases, els enzims modificadors d'aminoglicòsids i la cloramfenicol-acetiltransferasa. No es coneixen mecanismes d'inactivació enzimàtica que afecten als glicopèptids, encara que s'ha descrit de forma esporàdica per les tetraciclines. Recentment s'han descrit mecanismes de resistència de naturalesa plasmídica que afecten a les fluoroquinolones.

d) Modificació o hiperproducció de la diana

La resistència es produeix per mutacions que afecten a gens que codifiquen proteïnes que formen part de processos essencials per la supervivència del bacteri. En la majoria de les ocasions és suficient un sol canvi d'un aminoàcid per a que es manifesti la pèrdua d'activitat de l'antimicrobià (Tenover, 2001, 2006; Cantón *et al.*, 2011, Cuéllar, 2011). Depenent del tipus de proteïna afectada, podem diferenciar entre:

- (i) Resistència per modificació dels ribosomes. Confereix resistència a aminoglicòsids, tetraciclines, cloramfenicol, macròlids, lincosamides i linezolid. Exemples d'això serien, entre altres, la resistència de *Mycobacterium tuberculosis* a l'estreptomicina, la d'*Helicobacter pylori* a la claritromicina.
- (ii) Alteració de precursors de la paret (mureïna o peptidoglucà). El millor exemple, per la seva importància epidemiològica, és l'enterococ i la resistència als glicopèptids: es produeix la síntesi anormal de proteïnes amb un residu terminal D-alanina-D-

lactat, en lloc dels pèptids habituals acabats en D-alanina-D-alanina. Amb això s'afecta la unió de la vancomicina i la teicoplanina amb aquests precursors de la paret (veure el mecanisme d'acció dels antibiòtics beta-lactàmics a l'apartat 1.1.3.1). Aquest mecanisme és transferible i s'ha descrit recentment en *S. aureus*, encara que afortunadament les soques que el produeixen tenen problemes en la seva viabilitat.

- (iii) Modificació d'enzims essencials. Afecta a diferents grups d'antimicrobians. L'alteració de les PBPs ("penicillin-binding proteins": proteïnes fixadores de penicil·lina), proteïnes que catalitzen la síntesi del peptidoglucà, determina resistència als beta-lactàmics. Té major importància en els microorganismes Gram-positius que en els Gram-negatius i destaca en *S. pneumoniae* i *Enterococcus*, per la resistència a la penicil·lina, i en *S. aureus* per la resistència a tots els beta-lactàmics. També, les mutacions en els gens responsables de la síntesi de les topoisomerases (*gyrAB* o *parCE*) afecten a l'afinitat d'aquestes dianes per les quinolones. En l'actualitat, més del 30% dels aïllats d'*E. coli* són resistents a les fluoroquinolones per aquest mecanisme. La resistència a la rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis* es deu a mutacions en el gen *rpoB*, responsable de la síntesi de l'ARN-polimerasa.

S'ha descrit també un mecanisme de resistència plasmídic que afecta a les fluoroquinolones, i es degut a la producció de proteïnes que protegeixen les topoisomerases i impedeixen l'acció inhibidora de l'antibiòtic (Drlica *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2011). Aquest novedós mecanisme de resistència té gran importància epidemiològica degut a la seva major presència en bacteris que produeixen beta-lactamases amb ampli perfil hidrolític, com les beta-lactamases d'espectre estès (BLEEs) i carbapenemases.

e) Desenvolupament de rutes metabòliques que supleixen l'inhibida per l'antibiòtic

La resistència a les sulfamides i al trimetoprim pot deure's a la producció de dianes enzimàtiques alterades (essencialment les que afecten a dihidropteroato-sintetasa i dihidrofolato-reductasa, implicades en la biosíntesi d'àcid fòlic), però l'increment en la síntesi d'enzims no modificats també pot donar lloc a una inhibició parcial d'aquests enzims per part de l'antibiòtic i la conseqüent aparició de resistència. Aquesta major producció de la diana d'actuació també s'ha observat en *Enterococcus*, encara que en aquest cas es deu a la hiperproducció de PBPs (diana d'actuació dels antibiòtics beta-

INTRODUCCIÓ

lactàmics) (Huovinen *et al.*, 1995; Antunes *et al.*, 2005; Zaragoza *et al.*, 2006; Tenover, 2006; Kärpänoja *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2011).

Sorprenentment, s'han descrit mutants que sols són capaços de desenvolupar-se en presència de l'antibiòtic. Exemple d'això són els enterococs dependents de vancomicina, *M. tuberculosis* dependents d'estreptomicina i, menys freqüentment, els estafilococs coagulasa negatiu que depenen de penicil·lina. També s'han descrit soques d'*Acinetobacter baumannii* dependents de colistina. Aquest fenomen sols s'observa quan existeix antibiòtic en el medi de cultiu i s'explica per la producció de dianes alterades que únicament són funcionals quan són modificades per l'antibiòtic (Cantón *et al.*, 2011).

Els bacteris tendeixen a buscar estratègies que els permeten resistir a l'acció deletèria dels antimicrobians. Un mateix bacteri és capaç de desenvolupar diferents mecanismes de resistència front a un o més antibiòtics (multiresistència), de la mateixa manera, un antibiòtic pot ser inactivat per diferents mecanismes en diverses espècies microbianes (Daza Perez, 1998; Tenover, 2006; Cantón *et al.*, 2006b, 2011). A més, característiques com l'alta capacitat de reproducció i d'intercanvi genètic, i la ràpida selecció de mutants resistents espontanis com a conseqüència de l'ús d'antibiòtics, compliquen molt l'estudi de les resistències bacterianes als diferents antimicrobians (Weber & Courvalin, 2005; Aminov, 2011; Walsh, 2013).

Des d'un punt de vista genètic, la resistència als antimicrobians pot produir-se pels mecanismes basats en la modificació genètica del bacteri, que poden adquirir-se per:

1. Adquisició d'elements genètics que confereixen resistència als antimicrobians a partir d'altres bacteris. És imprescindible l'intercanvi genètic entre els microorganismes mitjançant mecanismes de recombinació genètica bacteriana (transformació, conjugació i transducció) (Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Aminov, 2011; Baquero, 2012; Baquero *et al.*, 2013).
2. Mutació en gens preexistents (encara que també deu considerar-se la possibilitat d'aparició de mutacions en gens adquirits prèviament per mecanismes de recombinació): mutació cromosòmica. Durant el procés de replicació tenen lloc mutacions que poden proporcionar al bacteri un avantatge competitiu front a un fàrmac respecte a la població inicial, de manera que al entrar en contacte amb el fàrmac, aquesta nova població de bacteris substituirà a la població inicial (Tenover, 2006; Baquero & Cantón, 2009; Giedraitaiene *et al.*, 2011; Cantón *et al.*, 2011).

1. Adquisició d'elements genètics que confereixen resistència als antimicrobians a partir d'altres bacteris

Alguns dels gens que s'adquireixen pels bacteris i que confereixen resistència als antimicrobians tenen el seu origen en els microorganismes que produeixen antibiòtics. Gràcies a aquests gens, els microorganismes són capaços de resistir a l'acció de l'antibiòtic que sintetitzen. Com exemple típic tindriem els enzims modificadors d'aminoglicòsids i algunes famílies de bombes que participen en els mecanismes d'expulsió. En altres casos, l'origen és desconegut. La resistència per transferència genètica és típica de bacteris que comparteixen nínxols ecològics amb altres microorganismes.

L'adquisició d'elements genètics de resistència succeeix a través de mecanismes utilitzats pels bacteris per l'intercanvi genètic. Entre aquests destaquen la internalització i recombinació amb material genètic (mecanismes de transformació), la transferència associada a plasmidis (mecanismes de conjugació) i l'associada a bacteriòfags (mecanismes de transducció). També s'ha reconegut la importància d'altres estructures genètiques que, junt amb els plasmidis, s'anomenen unitats de captura gènica i que participen en la transferència dels gens de resistència. Entre elles destaquen les seqüències d'inserció (IS) i els transposons. També s'han descrit altres estructures, anomenades integrons, que afavoreixen la captura de gens de resistència, augmentant les possibilitats de multiresistència del bacteri (Maguire *et al.*, 2001; Tenover, 2006; Baquero & Cantón, 2009; Baquero, 2012; Baquero *et al.*, 2013).

Des d'un punt de vista epidemiològic, els bacteris resistents amb gens de resistència associats a unitats de captura gènica tenen major transcendència clínica, ja que poden produir un increment de la resistència per desplaçament dels bacteris sensibles i generar epidèmies, però també poden transferir els gens de resistència a altres bacteris sensibles, inclòs a bacteris de distint gènere o amb diferent tinció de Gram (transferència trans-Gram) (Baquero & Cantón, 2009; Baquero *et al.*, 2013).

La recombinació per transformació (integració d'ADN exogen en el cromosoma bacterià) de material genètic amb transcendència en la resistència als antimicrobians està limitada a unes poques espècies bacterianes (Baquero & Cantón, 2009; Aminov, 2011; Baquero *et al.*, 2013). És responsable de la resistència als antibiòtics beta-lactàmics en *Neisseria meningitidis* o en *Streptococcus pneumoniae*. Aquests bacteris capten gens que participen en la síntesi de la paret cel·lular, com els que codifiquen les PBPs, que són la diana d'actuació dels beta-lactàmics.

INTRODUCCIÓ

La transferència de plasmidis, pel procés de conjugació bacteriana, té gran importància en la transmissió dels gens de resistència, sobre tot en els microorganismes Gram-negatius. Els plasmidis són unitats replicatives d'ADN que han evolucionat durant l'era antibiòtica mitjançant l'adquisició de gens de resistència. És important ressenyar que un plasmidi pot presentar més d'un gen de resistència i que un mateix bacteri pot albergar més d'un plasmidi amb gens de resistència diferents (Aminov, 2011, Baquero *et al.*, 2013).

La transferència de gens de resistència associada a bacteriòfags (per mecanismes de transducció) ha tingut aparentment menor transcendència, encara que és important en alguns microorganismes com *S. aureus*. En aquest patògen i en altres Gram-positius, la transferència s'ha produït gràcies a la mobilització de gens de resistència per transposons. Els de classe I són estructures genètiques que poden mobilitzar-se entre diferents cadenes d'ADN gràcies a que presenten IS en els seus extrems. Les IS són elements genètics bàsics amb capacitat de mobilitzar-se a sí mateixos degut a que tenen en els seus extrems seqüències repetides invertides. Quan es col·loquen en els dos extrems d'un fragment d'ADN que conté gens de resistència constitueixen els transposons de classe I. Estan molt difosos entre els bacteris Gram-positius i són responsables, entre altres coses, de la resistència als aminoglicòsids en *S. aureus*. Els transposons de classe II o conjugatius, àmpliament disseminats tant en bacteris Gram-negatius com Gram-positius, tenen una estructura més complexa, que els permet mobilitzar-se entre el cromosoma bacterià i els plasmidis que poden estar presents en el bacteri. Existeixen nombrosos exemples de gens de resistència associats a aquests transposons, tals com els responsables de la resistència a l'ampicil·lina en els enterobacteris, de la resistència a les tetraciclins o de la resistència als glicopèptids en l'enterococ. És de ressaltar que alguns d'aquests transposons conjugatius solen portar gens de resistència a metalls pesants, que podrien també actuar com factors de selecció.

La resistència associada a integrons es motiu d'investigació més recent. Aquestes estructures poden capturar gens de resistència, anomenats cassettes, que presenten a més seqüències genètiques que són reconegudes per seqüències homologues en l'integró (integrases) i que faciliten la seva integració i expressió. En general, els bacteris que presenten integrons són resistents a diferents famílies d'antimicrobians, ja que un mateix integró pot albergar diferents cassettes de resistència. Amb freqüència, els integrons són mobilitzats per transposons, i aquests a la vegada poden estar localitzats en plasmidis, amb el que es produeix un efecte multiplicador de les

possibilitats de disseminació dels gens de resistència, sobre tot baix la pressió selectiva dels antibiòtics (Maguire *et al.*, 2001; Baquero & Cantón, 2009; Aminov, 2011; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2012; Baquero *et al.*, 2013).

Molts dels integrans s'han descrit en microorganismes amb elevada importància sanitària, com *Salmonella typhimurium*. Altres es troben més difusos en ambients hospitalaris: en enterobacteris i en *Ps. aeruginosa* estan associats a gens de resistència que limiten les opcions terapèutiques, com les BLEEs, que impedeixen la utilització de cefalosporines d'ampli espectre, o les carbapenemes, que limiten la utilització dels carbapenems. El coneixement dels elements genètics responsables de la resistència a antibiòtics circulants en les diferents àrees geogràfiques és útil per establir polítiques d'utilització d'antimicrobians que tendeixen a limitar la dispersió dels gens de resistència i, amb això, dels bacteris que els presenten (Hernández *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2009; Oteo *et al.*, 2014a, 2014b).

2. Mutació en gens preexistents

Totes les poblacions bacterianes presenten de manera natural un nombre determinat de mutants (freqüència de mutació). La resistència mutacional té lloc en totes les poblacions bacterianes durant la replicació de l'ADN bacterià com conseqüència de la introducció de canvis incorrectes en la seqüència genètica de les seues bases. Alguns mutants (exclusivament per atzar) poden ser resistents als antimicrobians. Baix l'acció d'un antimicrobià els mutants resistents poden seleccionar-se, sobre tot en tractaments molt prolongats, acabant per ser dominants en tota la població bacteriana. És per això pel que els tractaments deuen ajustar-se en el temps, ja que durant un tractament prolongat és més probable que es produeixquen processos de selecció.

En condicions normals, el nombre de mutants augmenta conforme s'incrementa el nombre d'individus de la població bacteriana. Amb això s'eleva la probabilitat de selecció dels mutants resistents. La freqüència habitual amb la que es generen aquests mutants sol ser inferior a 10^{-8} . No obstant, existeixen poblacions que, baix situacions d'estrès mediambiental (deprivació de nutrients, baixa tensió d'oxigen, etc.) poden incrementar de manera important el nombre de mutants resistents que integren la població bacteriana (s'incrementa de 10 a 1000 vegades la freqüència de mutació). Aquestes poblacions s'anomenen hipermutadores i tenen defectes en els sistemes d'edició o reparació de l'ADN durant la replicació bacteriana. Baix l'acció dels antimicrobians, la selecció de mutants resistents en les poblacions hipermutadores és

INTRODUCCIÓ

molt més senzilla, inclòs amb inòculs baixos. El procés d'hipermutació es més prevalent entre microorganismes que produeixen infeccions cròniques, com *Ps. aeruginosa* en els pacients amb fibrosi quística o amb exacerbació de la bronquitis crònica. També s'han descrit en *H. pylori* (Oliver *et al.*, 2000; Cantón, 2011).

Entre el consum d'antibiòtics i el desenvolupament de resistències existeix una relació causal (Lázaro & Oteo, 2006; Levi & Marshall, 2004), que es sustenta en diferents fets:

(i) Les dades de tendència històrica de la CMI, posen de manifest que la CMI90 (concentració mínima necessària per a inhibir el 90% de la població bacteriana) de cada antibiòtic és major en l'actualitat que quan es va descobrir la molècula en concret.

(ii) Pacients dels quals s'extrauen més soques resistents han segut tractats amb major nombre d'antimicrobians en comparació als pacients dels quals s'obtenen major nombre de soques sensibles (Daza Perez, 1998; Baquero, 2012).

(iii) El patró d'ús d'antimicrobians en un entorn concret es relaciona habitualment amb l'aparició de resistències a tals fàrmacs en l'esmentat entorn.

Des de l'inici de l'ús massiu d'antibiòtics, es va observar que el control dels microorganismes no era tasca fàcil. El coneixement de la biologia microbiana va demostrar la seva elevada plasticitat per adaptar-se al medi i a la presència d'antimicrobians. Algunes característiques microbianes, com l'alta capacitat de multiplicació, la capacitat d'intercanvi genètic i la ràpida selecció de mutants resistents espontanis en resposta a la pressió selectiva generada per l'ús dels antibiòtics, van demostrar ràpidament la dificultat del seu control. La introducció inicial de la penicil·lina, i posteriorment d'altres molècules amb capacitat antimicrobiana, va permetre comprovar ràpidament que les característiques específiques de certs grups bacterians impedeixen la seva destrucció per alguns quimioteràpics antimicrobians (resistència intrínseca, els mecanismes de la qual s'han indicat anteriorment). Tanmateix, la resistència a antibiòtics de major impacte en salut pública és la resistència adquirida, mitjançant la qual microorganismes presents en una població microbiana, prèviament sensibles a l'acció d'un antibiòtic, poden tornar-se, mitjançant mecanismes adaptatius (resistència adquirida, de la que s'han descrit els mecanismes anteriorment), resistents a un o varis antibiòtics, i això els permet sobreviure en la seva presència (Levi & Marshall, 2004; Cantón *et al.*, 2006a, 2006b, 2011; Karaiskos & Giamarellou, 2014; Vasoo *et al.*, 2015).

Com s'ha indicat abans, existeix una relació causal entre el consum d'antibiòtics i el desenvolupament de resistències. Aquesta relació és complexa, ja que també influeixen

altres factors. L'important desenvolupament de nous antibiòtics en la segona meitat del segle XX (que no eren inactivats pels bacteris que posteriorment han desenvolupat resistències), va contribuir a pal·liar relativament aquest problema. No obstant, el desenvolupament en els últims anys de noves molècules antimicrobianes d'ús terapèutic ha baixat significativament, per això existeix una amenaça real de que el nostre arsenal terapèutic es pugui veure superat en el futur per la ràpida capacitat adaptativa dels bacteris (Ball *et al.*, 2004; Shah, 2005; Cantón *et al.*, 2006a; Page & Heim, 2009; Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Mouton *et al.*, 2011; Bush, 2012).

Espanya és un dels països europeus més afectat pels fenòmens de resistència. Encara que les freqüències de resistència dels aïllats d'origen nosocomial són similars a la dels països del nostre entorn, les freqüències de resistència en bacteris d'origen comunitari (no hospitalari) són de les més altes de la Comunitat Europea. Aquesta observació concorda amb el fet de que en Espanya el consum d'antibiòtics en la comunitat és especialment elevat (el 90% dels antibiòtics es consumeix a nivell extra-hospitalari). El consum d'antibiòtics en Espanya va assolir en la comunitat un màxim en 1995, amb un 22,12 de dosi diària definida (DDD) per mil habitants i dia (DHD). Aquest consum va disminuir fins l'any 2001 (18 DHD) i posteriorment es va registrar un lleuger augment, arribant en l'any 2005 a 19,3 DHD, sent en el grup de les penicil·lines on es concentra el consum, que en 2009 va assolir el 62,6% del total d'antimicrobians d'ús sistèmic (Lázaro & Oteo, 2006; Nogueira, 2011; Quirce & Freire, 2011).

1.1.3. PRINCIPALS GRUPS DE QUIMIOTERÀPICS ANTIBACTERIANS: MECANISME D'ACCIÓ, ESPECTRE I RESISTÈNCIES

Els antibacterians constitueixen un ampli grup de fàrmacs amb característiques químiques i farmacològiques molt diverses. Tradicionalment, s'han agrupat en distintes famílies en funció de la seva estructura química, vinculada al seu mecanisme d'acció, al seu perfil toxicològic i al seu espectre d'activitat antibacteriana.

Òbviament, el nombre de components i la rellevància clínica de cadascun dels grups d'antibacterians és molt diferent. A més, el desenvolupament de nous fàrmacs i l'evolució clínica de la pràctica antibacteriana han fet que l'ús d'alguns dels productes més antics, i d'altres més moderns, hagi sigut progressivament abandonat. Tot això fa que estiguem davant d'un dels grups més heterogenis i dinàmics de tot l'àmbit de la farmacologia (Gilbert *et al.*, 2006; Finch *et al.*, 2010; Mandell *et al.*, 2010; Cuéllar, 2011). A continuació

INTRODUCCIÓ

es descriuen els principals grups d'antibacterians classificats en funció de la seva estructura química, que determina el seu mecanisme d'acció (Fig. 1. 2)

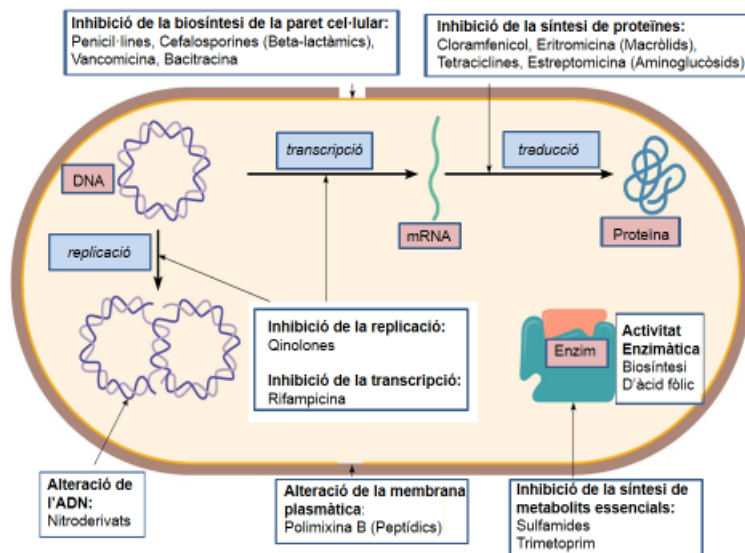


Fig. 1.2. Esquema de la cèl·lula bacteriana on s'indiquen les principals dianes d'actuació dels quimioteràpics antibacterians (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

1.1.3.1. Antibacterians beta-lactàmics

L'element característic d'aquest ampli grup d'antibacterians és la presència d'un nucli químic comú, el beta-lactàmic, que és responsable d'un mateix mecanisme d'acció. Malgrat els 70 anys que porten utilitzant-se en clínica, els antibacterians beta-lactàmics mostren un potencial terapèutic extraordinari (és el grup d'antibacterians més utilitzat en Espanya i en la Unió Europea, amb una quota de mercat que oscil·la entre el 55% i el 65%) (Cuéllar, 1996; Martín & Gudiol, 2003; Cuéllar, 2006, Suárez & Gudiol, 2009; Cuéllar, 2011).

L'anell beta-lactàmic és una amida cíclica que prové de la condensació d'un grup carboxil i altre amino en la mateixa cadena hidrocarbonada (lactama), mentre que el prefix beta- indica que es tracta d'un anell de quatre membres o, el que és el mateix, que els grups amino i carboxílic estaven separats per dos àtoms de carboni abans de condensar-se (Fig. 1.3).

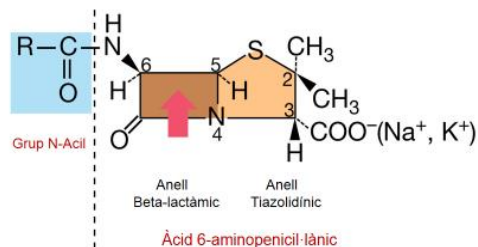
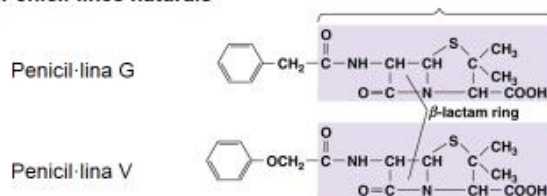


Fig. 1.3. Estructura bàsica de les penicil·lines (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

(a) Penicil·lines naturals



(b) Penicil·lines semisintètiques

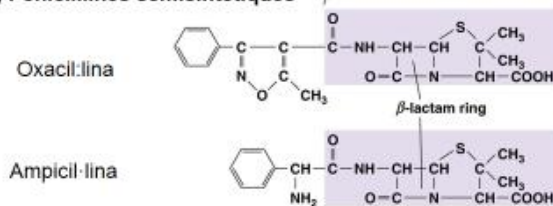


Fig. 1.4. Estructura d'algunes penicil·lines (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

Les penicil·lines deriven d'una estructura de dipèptid formada per la condensació dels aminoàcids cisteïna i valina. Aquesta estructura es sembla en gran mesura a la de D-ala-D-ala del pentapèptid, precursora de la mureïna de la paret cel·lular bacteriana. El nucli bàsic de les penicil·lines està format per la condensació d'un anell de quatre membres (beta-lactama) i altre de cinc (tiazolidina) (Fig. 1.3). Aquest nucli s'anomena penama o nucli penàmic. Degut a les limitacions que presentaven les primeres penicil·lines (eren lables en medi àcid i bàsic, per això no podien administrar-se per via oral, tenien una vida mitja curta per la seva elevada solubilitat en aigua i la seva ràpida eliminació per orina, s'inactivaven per beta-lactamases i el seu espectre d'acció es limitava a bacteris Gram-

INTRODUCCIÓ

positius), es va afavorir la recerca i desenvolupament de nous compostos amb propietats millorades. Es van obtenir penicil·lines semisintètiques resistents a àcids, a beta-lactamases i penicil·lines d'ampli espectre (Cuéllar, 1996, 2006; Suárez & Gudiol, 2009; Amsden *et al.*, 2010; Mandell *et al.*, 2010; Cuéllar, 2011) (Fig. 1.4)

Les cefalosporines es diferencien de les penicil·lines en que el segon anell és de sis membres (tiazina), per expansió de l'anell tiazolidina. Açò implica la pèrdua d'un dels dos grups metil laterals de les penicil·lines i la formació d'un doble enllaç dins d'aquest anell tiazínic. D'aquesta manera, sorgís el nucli de les cefemes (cefèmic). A partir d'aquests dos nuclis bàsics s'han obtingut, per mètodes sintètics o semisintètics, una àmplia gamma de beta-lactames (Cuéllar, 1996; Page & Heim, 2009; Cuéllar, 2011) (Fig 1.5).

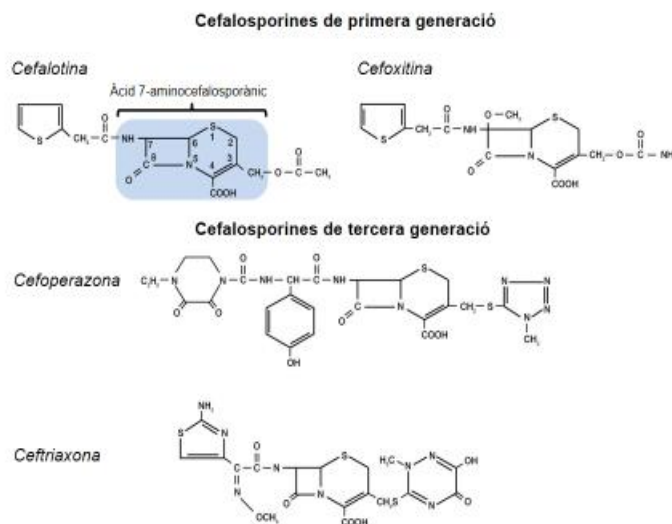


Fig. 1.5. Estructura d'algunes cefalosporines (modificat de Willey *et al.*, 2009).

Actualment hi ha una sèrie de molècules antibacterianes que contenen en la seva estructura l'anell beta-lactàmic. L'estructura bàsica dels distints grups s'indica a continuació (Fig. 1.6):

- (i) *Penicil·lines*: anell beta-lactàmic associat a altre tiazolidínic de cinc components, donant origen a un nucli responsable de la seva activitat biològica, l'àcid 6-aminopenicil·lànic.

(ii) *Cefalosporines*: anell beta-lactàmic associat a altre dihidrotiazidínic de sis components, formant així l'àcid 7-aminocefalosporànic.

(iii) *Àcid clavulànic*: a partir del nucli penàmic (el de les penicil·lines) es desenvolupen els oxapenams (anell oxazolidínic).

(iv) *Carbapenems*: l'estructura química dels carbapenems es diferencia de les penicil·lines per tenir un àtom de carboni en volta d'un àtom de sofre en la posició C1 de la tiazolidina, i un enllaç no saturat entre els àtoms 2 i 3 de l'anell pentamèric, donant lloc a un anell pirrolínic.

(v) *Monobactames*: l'anell beta-lactàmic no està condensat amb ningun altre anell, sols està lligat a grups funcionals aïllats o restes acíclics.

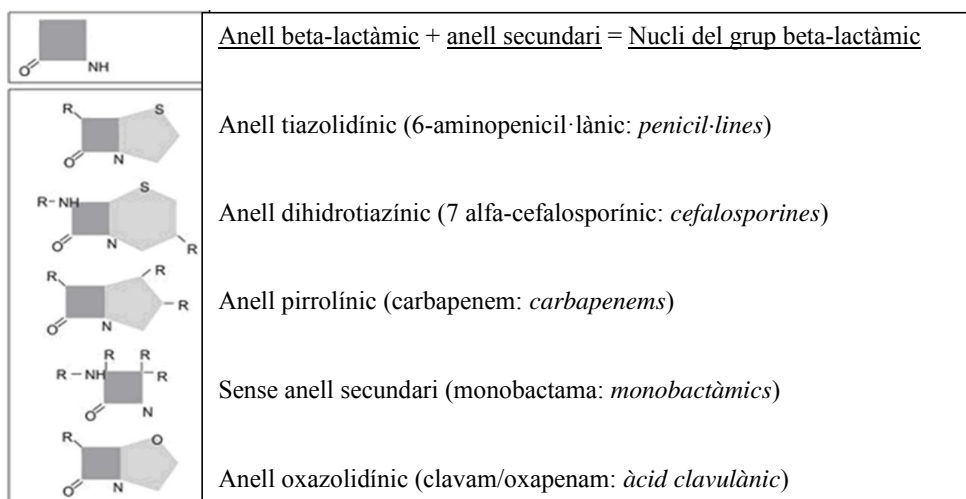


Fig. 1.6. Estructures bàsiques dels principals grups d'antibiòtics beta-lactàmics (modificat de Suárez & Gudiol, 2009).

Mecanisme d'acció

Els antibacterians beta-lactàmics actuen inhibint els processos de síntesi i reparació de la paret cel·lular bacteriana, provocant l'aparició d'erosions o forats en la xarxa polimèrica de peptidoglucà (mureïna) de la paret, i permetent així el contacte directe entre la membrana plasmàtica i l'agressiu entorn químic extern, generalment hipotònic respecte de l'interior

INTRODUCCIÓ

del bacteri. La pèrdua de la funcionalitat de la paret cel·lular bacteriana condueix a la formació de protoplasts en medis isotònics, però en medis hipotònics causa la lisi bacteriana per trencament de la membrana plasmàtica.

La coberta dels bacteris varia substancialment d'una espècie a altra, però col·lectivament s'aprecien diferències qualitatives entre els bacteris Gram-positius i Gram-negatius. Els Gram-negatius disposen d'una membrana citoplasmàtica i rodejant a aquesta membrana existeix el que es coneix com espai periplàsmic, que a la vegada està tancat per una xarxa de peptidglucà i, finalment, per una membrana externa.

Pel contrari, la coberta dels bacteris Gram-positius és més simple (la membrana externa no està present), però conté una xarxa molt més atapeïda de peptidglucà que els Gram-negatius.

La capa de peptidglucà està formada per fibres polimèriques estretament entrelaçades, que formen una estructura reticular, i la seva missió essencial és proporcionar rigidesa a la coberta bacteriana, permetent al bacteri sobreviure en entorns químics agressius. En aquest sentit, l'osmolaritat citoplasmàtica bacteriana és usualment molt major (fins 20 atmosferes) que la de les cèl·lules eucariotes (7,6 atmosferes), incloent a les humanes. Sense la paret cel·lular i la xarxa de peptidglucà, el protoplast bacterià (citoplasma i membrana) s'inflaria i esclataria, degut a la seva hipertonicitat respecte al medi (generalment hipotònic).

La capa de peptidglucà està composta per cadenes formades per la repetició d'unitats d'àcid N-acetilglucosamina (NAG) i àcid N-acetilmuràmic (ANAM) que conté un tetrapèptid unit a l'ANAM. L'entrecruament entre cadenes es produeix per la formació de un enllaç covalent entre el tercer aminoàcid d'un tetrapèptid i el quart aminoàcid d'un tetrapèptid de una cadena distinta. Aquest enllaç es forma de manera directa en bacteris Gram-negatius i mitjançant un pont peptídic en bacteris Gram-positius (pentapèptids de glicina en *S. aureus*) (Fig. 1.7). És important tenir en compte que la D-alanina és un aminoàcid que no està present en cap animal superior (vertebrat), això el fa únic com potencial substrat bacterià.

La reacció d'entrecruament de les cadenes de peptidglucà està catalitzada per un enzim anomenat peptidglucà-transpeptidasa, localitzat en la membrana cel·lular bacteriana, que es inhibeix pels antibiòtics beta-lactàmics (Fig. 1.8). La falta d'entrecruament de les cadenes de peptidglucà condueix a una paret fràgil i soluble, incapaç de protegir al bacteri de l'agressió de l'entorn químic (hipotònic), conduint a la lisi cel·lular i a la mort del bacteri. A més, la formació de forats o erosions té lloc habitualment en les zones de

creixement de la paret cel·lular i si els desperfectes són suficientment importants, tindrà lloc l'efecte indicat.

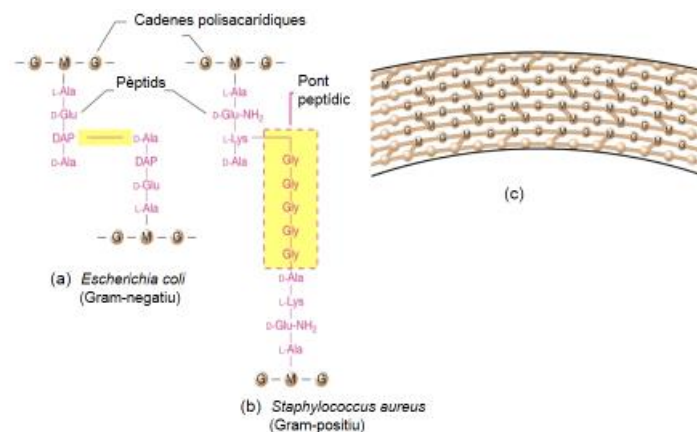


Fig. 1.7. Representació de l'enllaç peptídic encreuat que uneix cadenes distintes de peptidoglucà en bacteris Gram-positius (a) i Gram-negatius (b), i xarxa tridimensional de mureïna (c) (modificat de Madigan *et al.*, 2009). G: NAG; M: ANAM.

Els antibiòtics beta-lactàmics no sol són capaços d'inactivar a la transpeptidasa, sinó també a altres enzims bacterians implicats en altres processos lligats a la síntesi i reparació de la paret bacteriana, com les carboxipeptidases i les endopeptidases. En definitiva, els antibacterians beta-lactàmics actuen mitjançant la unió a un conjunt de proteïnes enzimàtiques presents en la membrana bacteriana, implicades en els processos de transpeptidació i endopeptidació, conegudes genèricament com PBPs (*penicillin-binding proteins*, proteïnes fixadores de penicil·lina). Cada espècie bacteriana presenta una combinació i tipologia específica de PBPs. Inclòs poden haver soques mutants amb variacions tipològiques en una mateixa espècie. Així, per exemple, el bloqueig de PBP1a i PBP1b provoca la lisi cel·lular en bacteris de l'espècie *Escherichia coli* (però no quan es bloqueja sol un dels subtipus), mentre que el de PBP2 provoca el cessament del creixement de la paret bacteriana, promovent formes esferoïdals, molt més inestables que les bacil·lars. Per la seva part, el bloqueig de les PBP3 impedeix la formació del sept, en la divisió cel·lular, donant lloc a formes filamentoses. Pareix que les restants PBPs tenen menys importància, des del punt de vista dels antibiòtics beta-lactàmics (Cuéllar, 1996; Martín & Gudiol, 2003; Cuéllar, 2006; Suárez & Gudiol, 2009; Cuéllar, 2011).

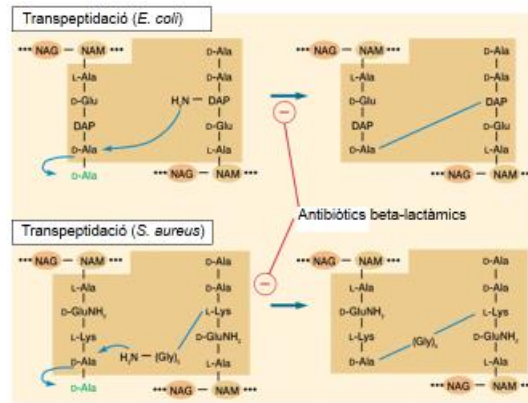


Fig. 1.8. Mecanisme d'acció dels antibiòtics beta-lactàmics: inhibició de la transpeptidació que enllaça les cadenes de mureïna de la paret cel·lular bacteriana (modificat de Madigan *et al.*, 2009). NAM: ANAM.

Per a poder actuar sobre les PBP's és precís que els antibiòtics beta-lactàmics accedeixin al lloc on es troben aquestes, normalment en la superfície exterior de la membrana citoplasmàtica, per baix de la paret, pròxim a l'espai periplàsmic. Aquesta capacitat de penetració es coneix com cripticitat i és específica per a cada antibiòtic (depenent de la seva estereoquímica i lipofília) i espècie bacteriana (o inclòs per a cada soca).

Adicionalment, els antibiòtics beta-lactàmics són susceptibles d'actuar mitjançant l'activació d'una autolisina endògena bacteriana, capaç de destruir el peptidoglucà. Aquest mecanisme apareix generalment quan les concentracions d'antibiòtic beta-lactàmic superen al menys en quatre vegades la CMI per a un bacteri determinat. En el cas de les espècies no productores d'autolisina, els bacteris són inhibits, però no destruïts, constituint el que es coneix com tolerància, i que es caracteritza per que es requereix una concentració al menys 32 vegades major que la CMI per a que un antibacterià destrueixca una determinada soca bacteriana.

Mecanismes de resistència bacteriana

Són diversos els mecanismes bioquímics mitjançant els que els bacteris adapten la seva bioquímica per evitar l'acció letal dels agents beta-lactàmics. Els principals poden resumir-se en tres mecanismes: (i) disminució de la concentració de l'antimicrobià a l'espai periplàsmic, (ii) modificacions genèticament transmissibles en l'estructura i funció de les

PBPs, i (iii) producció d'un o més tipus de beta-lactamases (Cuéllar, 1996; Martín & Gudiol, 2003; Rybak, 2004; Cuéllar, 2006; Suárez & Gudiol, 2009; Cuéllar, 2011).

En general, els bacteris Gram-negatius són resistents a un major nombre d'antimicrobians que els Gram-positius degut a la presència en els primers de la membrana externa, que constitueix una eficient barrera d'impermeabilitat. Els canals proteics o porines limiten la penetració de molècules hidrofíliques, com és el cas dels antibacterians beta-lactàmics. Tanmateix, la permeabilitat a través de les porines depèn de l'espècie i de la soca bacteriana, tan com de la grandària i càrrega elèctrica de l'agent beta-lactàmic. Normalment, la resistència es produeix quan aquestes porines sofreixen canvis estructurals, alterant la permeabilitat a diferents beta-lactàmics i disminuint la seva concentració en l'espai periplàsmic, fins el punt d'impedir l'activitat antibacteriana del beta-lactàmic, ja que aquest no pot accedir a les PBPs, les seves dianes farmacològiques. Aquest mecanisme és rellevant, per exemple, en *Enterobacter cloacae* i *Ps. aeruginosa*.

L'altre mecanisme que influeix en la disminució de l'antimicrobià dins del bacteri és l'eflux o expulsió d'antimicrobians, que sol complementar al mecanisme anterior de resistència. Es deu a l'existència de bombes d'eflux, de les que s'han descrit dos formes. La primera compliria la funció de transportar el fàrmac a l'espai periplàsmic, d'escassa rellevància generalment. La segona és més complexa i consta de tres subunitats: una proteïna transportadora en la membrana citoplasmàtica, un canal en la membrana externa i una proteïna lligadora localitzada en l'espai periplàsmic, que connecta les dos anteriors. Aquestes bombes s'han relacionat amb la resistència d'*E. coli*, *Ps. aeruginosa* i *Neisseria gonorrhoeae* a diferents beta-lactàmics.

Per altra banda, les variacions estructurals de les PBPs també poden ser responsables de la pèrdua o reducció de l'activitat antibacteriana dels beta-lactàmics que, si es transmeten genèticament, poden arribar a tenir certa transcendència clínica. Aquest mecanisme pareix ser comunament el responsable de la resistència en bacteris Gram-positius, que produeixen PBPs estructuralment alterades amb baixa afinitat per als beta-lactàmics. Entre els patògens que utilitzen aquest sistema de resistència s'inclouen espècies dels gèneres *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Staphylococcus*. En el cas dels bacteris Gram-negatius, la disminució d'afinitat de les PBPs no és un mecanisme de resistència important, encara que s'ha documentat la seva existència en *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* i *Ps. aeruginosa*.

Tanmateix, la forma de resistència bacteriana més comú als antibiòtics beta-lactàmics es basa en la producció d'un grup d'enzims de tipus amidohidrolasa, conegudes

INTRODUCCIÓ

genèricament com beta-lactamases. Aquests enzims actuen com falses dianes per l'antibiòtic beta-lactàmic, comportant-se químicament com si foren PBPs. D'aquesta manera, poden formar enllaços covalents estables amb l'antibiòtic, provocant l'obertura de l'anell beta-lactàmic i conseqüentment l'inactivació biològica del antibacterià (Fig. 1.9). Després de l'hidròlisi (fàcil en les beta-lactamases i difícil en les PBPs), es regenera la molècula de beta-lactamasa, però s'inactiva definitivament la de l'antibiòtic (Colodner, 2005; Berrazeg *et al.*, 2014).

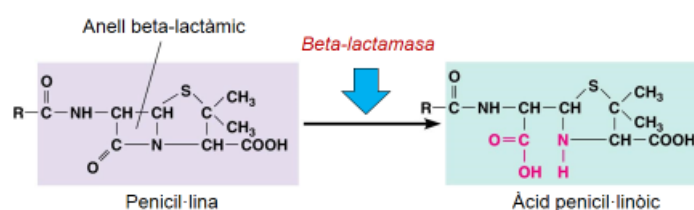


Fig. 1.9. Hidròlisi de l'anell beta-lactàmic per l'acció de les beta-lactamases (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

Les beta-lactamases es poden classificar atenent a diferents criteris. Segons la especificitat del substrat i la susceptibilitat al àcid clavulànic es poden distingir quatre tipus o grups (Bush, 1989; Bush & Jacoby, 2010; Bush, 2012):

- (i) *Grup 1*, constituït per cefalosporinases cromosomals i també plasmídiques, presents en bacils Gram-negatius (*Enterobacteris* i *Bacteroides* spp., entre altres). No són inactivades per l'àcid clavulànic.
- (ii) *Grup 2*, inclou un ampli grup d'enzims (penicil·linases, cefalosporinases beta-lactamases d'ampli espectre) presents en nombroses espècies bacterianes Gram-negatives, i en menor extensió en bacteris Gram-positius, que es caracteritzen per ser inactivades per l'àcid clavulànic.
- (iii) *Grup 3*, inclou metal·lo-enzims presents en bacteris Gram-positius (com *Bacillus cereus*) i Gram-negatius (espècies dels gèneres *Stenotrophomonas*, *Legionella*, *Flavobacterium*, etc.), que no són inactivades per l'àcid clavulànic.
- (iv) *Grup 4*, engloba penicil·linases descrites en bacteris Gram-positius i Gram-negatius (gèneres *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.), que no són inactivades pel àcid clavulànic.

Les diferències entre beta-lactamases i PBPs van ser objecte d'una línia d'investigació, enfocada cap el desenvolupament d'inhibidors "suïcides" (no regenerables) de beta-lactamases, amb la fi de potenciar l'efecte bactericida dels antibiòtics beta-lactàmics. Fruit d'aquesta línia són varies molècules, com l'àcid clavulànic, el sulbactam i el tazobactam. Les beta-lactamases dels grups 1, 3 i 4, constitueixen un important problema clínic o terapèutic ja que no són inactivades pels inhibidors de beta-lactamases actualment en ús. Entre les beta-lactamases amb major implicació clínic, dins dels bacteris Gram-positius, cal citar a les estafilocòciques, molt esteses per tot el món. La seva transcendència és tal que ha provocat el desenvolupament de penicil·lines específicament antiestafilocòciques (isoxazolilpenicil·lines).

Segons altre criteri, les beta-lactamases, que contenen serina en el centre actiu de l'enzim, es classifiquen en tres grans grups: (i) el format per els enzims que actuen preferentment sobre penicil·lines, per això s'anomenen penicil·linases; (ii) altre grup format per beta-lactamases més selectives front a les cefalosporines (cefalosporinases); (iii) les beta-lactamases d'ampli espectre, que actuen tant sobre penicil·lines com sobre cefalosporines i altres antibiòtics beta-lactàmics (Colodner, 2005; Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Bush, 2012; Lynch *et al.*, 2013; Nordmann, 2014).

Molts dels gens que codifiquen beta-lactamases en bacteris patògens i que normalment estaven limitats a la transmissió cromosòmica de la resistència, poden mobilitzar-se com plasmidis i integrons, elements genètics dinàmics que per un mecanisme de recombinació específic amplifiquen la difusió de la resistència bacteriana. Inclòs, en alguns enterobacteris, l'alteració concomitant de les porines actua conjuntament amb aquests gens transmissibles de beta-lactamases, conferint resistència als antibiòtics beta-lactàmics més potents, incloent combinacions amb inhibidors de beta-lactamases.

Espectre antibacterià

1. Penicil·lines

Els diferents grups en que poden ser enquadrades les penicil·lines actualment disponibles presenten uns espectres antibacterians prou diferents entre sí (Martín & Gudiol, 2003; Cuéllar, 2006; Suárez & Gudiol, 2009; Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Cuéllar 2011):

INTRODUCCIÓ

(i) *Penicil·lines sensibles a beta-lactamases*

Són les penicil·lines més antigues (bencilpenicil·lina, procaïna o benzatina i fenoximetilpenicil·lina), encara que segueixen sent perfectament vàlides en infeccions provocades per bacteris susceptibles. Són actives front a Gram-positius no productors de penicil·linasa i certs Gram-negatius, sobre tot *Neisseria*, però no front a enterobacteris, *Pseudomonas* i la majoria dels bacteris Gram-negatius.

(ii) *Isoxazolilpenicil·lines*

Són penicil·lines d'espectre reduït front a Gram-positius, però menys actives que les bencilpenicil·lines. Tanmateix, presenten la peculiaritat de no ser degradades per les penicil·linases de *S. aureus*. La seva principal aplicació són les infeccions per streptococs i estafilococs resistents a les penicil·lines convencionals. S'han utilitzat també com inhibidors de penicil·linasa, associats a penicil·lines d'ampli espectre i deixant a aquestes el paper antibiòtic principal. En aquesta aplicació han sigut substituïdes per les associacions del tipus amoxicil·lina/clavulànic. Actualment sols està comercialitzada en Espanya la cloxacil·lina, encara que el grup estava format abans per dicloxacil·lina, flucloxacil·lina i oxacil·lina.

(iii) *Aminopenicil·lines*

El grup amino (-NH₂) en posició alfa respecte al grup carboxamida estableix la molècula en medi àcid. A més, la inclusió del grup amino fa que el conjunt sigui un anàleg estructural de nutrients de tipus tripèptid, pels quals existeix un sistema biològic de transport actiu a través de l'epiteli digestiu, el que facilita l'absorció digestiva d'aquest grup de penicil·lines. Són efectives front a bacteris Gram-positius i Gram-negatius, encara que algunes espècies d'aquest últim grup (especialment *Ps. aeruginosa*) són resistents. Són sensibles a les penicil·linases. L'ampicil·lina va ser la primera penicil·lina d'ampli espectre. El seu inconvenient és que la seva absorció oral és baixa. L'amoxicil·lina és probablement el millor antibiòtic d'aquest grup, amb característiques farmacocinètiques millors que les de l'ampicil·lina, tant per via oral com parenteral.

(iv) *Acilureidopenicil·lines*

Són menys actives que les anteriors aminopenicil·lines front a la majoria dels bacteris Gram-positius, però molt més efectives front a *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Serratia* o *Klebsiella*. Són d'ús exclusivament parenteral, actualment sol permaneix la piperacil·lina i associada a un inhibidor de beta-lactamases, el tazobactam.

Químicament constitueixen un cas especial de les aminopenicil·lines. L'amidificació del grup amino fa perdre per complet la capacitat de ser absorbides en el tracte digestiu. A

canvi, provoca un important augment de l'activitat front a bacteris Gram-negatius, especialment enterobacteris (*E. coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, etc.) i *Ps. aeruginosa*. L'estructura ureídica també s'utilitza en diverses cefalosporines d'ampli espectre (cefoperazona, ceftriaxona).

(v) *Inhibidors de beta-lactamases*

Són anàlegs estructurals de les penicil·lines, sent el seu objectiu actuar com substrats suïcides (irrecuperables) de diversos tipus de beta-lactamases, es a dir, a diferència de les penicil·lines i cefalosporines, l'unió enzim-substrat no és làbil, i el resultat és la inactivació de la beta-lactamasa. Per si mateix manquen d'activitat antibacteriana, però associats a antibiòtics beta-lactàmics són capaços d'ampliar sensiblement l'espectre antibacterià d'aquests últims. Els inhibidors de beta-lactamases comercialitzats fins ara tenen una estructura penàmica, si bé un àtom de sofre (S) es substituït per oxigen (O) o està oxidat en forma de sulfona (SO₂). Açó produeix una major reactivitat de l'anell beta-lactàmic amb la zona activa de l'enzim.

Ja que la producció de beta-lactamases és el principal mecanisme de resistència microbiana als antibiòtics beta-lactàmics, i particularment a les penicil·lines, l'addició d'un inhibidor de penicil·linases augmenta significativament l'espectre d'acció d'aquests antibiòtics. Aquest espectre àmpliat inclou ara als microorganismes que són naturalment susceptibles, als que inicialment ho eren però han deixat de ser-ho per la difusió de soques productores de penicil·linases (com el *S. aureus*), i també inclou a espècies del gènere *Klebsiella* i a *Bacteroides fragilis*, on la producció de penicil·linases és tan natural que tradicionalment s'havien considerat fora de l'espectre de les penicil·lines.

La principal limitació està en que els medicaments actualment disponibles inhibeixen la majoria de les penicil·linases, però no totes. Tampoc són sensibles les soques d'estafilococs meticil·lina-resistents (Otto, 2012), ni en general els bacteris resistents perquè la penicil·lina no penetra en la paret bacteriana.

Hi han tres inhibidors de penicil·linases. L'àcid clavulànic és una substància natural produïda per una espècie de *Streptomyces*; pel contrari, sulbactam i tazobactam són sintètics. Tenen un similar espectre anti-beta-lactamases, especialment l'àcid clavulànic i el tazobactam, mentre que el sulbactam és un poc menys actiu, especialment front a les de tipus III. L'àcid clavulànic s'utilitza en antibioteràpia oral, i els altres dos són injectables, amb interès especial en infeccions on pot haver bacteris Gram-negatius productors de penicil·linasa de tipus I, ja que, encara que no l'inhibeixquen, al menys no indueixen la seva producció, com passa amb l'àcid clavulànic.

INTRODUCCIÓ

Donat que aquests productes sol s'usen en associació, les diferències que poden haver entre ells aïlladament a penes tenen interès pràctic. Els medicaments que s'utilitzen són sempre combinacions amb una penicil·lina d'ampli espectre, que es la que en definitiva va a determinar l'aplicació terapèutica. Amoxicil·lina-clavulànic (Augmentine^R) i ampil·lina-sulbactam tenen un espectre antibacterià molt semblant. L'associació piperacil·lina-tazobactam, té un espectre d'acció més ampli que les anteriors i major activitat front a Gram-negatius.

2. Cefalosporines

Aquest grup es superposa pràcticament amb el de les penicil·lines per tenir una estructura química molt pareguda i idèntic mecanisme d'acció. En general, no hi han raons terapèutiques de pes per elegir entre penicil·lines i cefalosporines.

Les aminocefalosporines constitueixen la “versió cefalosporínica” de l'ampil·lina i congèneres (aminopenicil·lines). En general, l'absorció digestiva és millor que la d'aquestes últimes, així com l'acció front a bacteris Gram-positius. Les arilmetilcefalosporines (cefactor, cefoperazona i cefazolina) són la versió corresponent a la bencilpenicil·lina i congèneres, si bé disposen de major activitat que aquestes últimes front a enterobacteris. En les hidroxicefalosporines, el grup hidròxil en la cadena lateral incrementa l'activitat front a Gram-negatius, però a costa de perdre part de l'activitat front als Gram-positius. Tenen cert grau de resistència a diversos tipus de beta-lactamases. Com els grups anteriors, no tenen efectes significatius sobre *Pseudomonas*, i la seva acció anti-anaeròbis és molt moderada, en general.

Les cefamicines són anàlegs de les arilmetilcefalosporines, però amb un notable increment de la resistència a les beta-lactamases de nombrosos bacteris, molt especialment de certes espècies anaeròbiques (*Bacteroides*) i enterobacteris.

Les metoxiiminocefalosporines presenten estabilitat front a les beta-lactamases dels Gram-negatius i una major activitat front Gram-negatius, a costa de minvar l'activitat front als Gram-positius. Existeixen dos subgrups diferenciats: els derivats furànics i els aminotiazòlics. Entre els primers, la cefuroxima, amb un espectre antibacterià intermedi, encara que més bolcat cap els Grams-negatius. Molt més importants són els derivats aminotiazòlics (cefpiroma i cefepima), que presenten una notable activitat front a enterobacteris amb una significativa resistència a diversos tipus de beta-lactamases (Gootz, 2004; Cuéllar, 2006, 2011).

És freqüent trobar a les cefalosporines en la literatura científica classificades en generacions, en base a la seva activitat sobre bacteris Gram-negatius, progressivament major per a cada generació. Està classificació no és la més idònia perquè indueix a confusió, donat que les característiques dels membres de cada generació no són homogènies i el grau d'innovació terapèutica de les successives cefalosporines és menor del que la paraula generació suggereix. Segons el tipus i l'amplitud del seu espectre antibacterià, les cefalosporines poden classificar-se en diferents grups (Cuéllar, 2011):

(i) *Cefalosporines orals d'acció preferent contra Gram-positius* (cefaclor, cefalexina i cefadròxil). Són molt actives front a Gram-positius i menys front a Gram-negatius, sent *Neisseria* especialment sensible i també és efectiu front a *H. influenzae* i *Proteus mirabilis*.

(ii) *Cefalosporines injectables d'acció preferent front a Gram-positius* (cefalotina, cefazolina i cefradina). Són més actives que les orals front a Gram-negatius. Baix el punt de vista bacteriològic i clínic, els medicaments del grup són equivalents.

(iii) *Cefalosporines orals d'acció preferent sobre Gram-negatius* (cefixima, cefitibuteno, cefpodoxima proxetilo, cefditoren pivoxilo). Són especialment actives sobre Gram-negatius, encara que algunes tenen també activitat molt alta front a Gram-positius. En qualsevol cas, en infeccions per Gram-positius es guanya poc clínicament usant aquests medicaments en lloc dels grups abans comentats. En general són poc actives front a *Pseudomonas*, *Proteus* o anaerobis.

(iv) *Cefalosporines injectables d'acció preferent sobre Gram-negatius*. L'activitat front a Gram-positius és inferior (o, en qualsevol cas, no superior) a la dels del grup de la cefazolina, però són molt més actives front a Gram-negatius. *Pseudomonas* sol ser poc susceptible, llevat de les cefalosporines de quarta generació.

Del grup d'antibiòtics de segona generació (cefonicida i cefuroxima), la cefuroxima és significativament més estable front a beta-lactamases, i l'espectre és un poc més ampli que els de cefazolina i cefonicida. La penetració en el líquid cèfalo-raquidi és molt bona i és una de les cefalosporines preferides en el tractament de la meningitis.

Els espectres d'acció dels compostos de tercera generació (la cefotaxima és el referent del grup) són bàsicament iguals (de fet són dels més amplis entre les cefalosporines). Tenen major activitat que les anteriors front a *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* i meningococs. Tenen també característiques adequades per a ser usades en meningitis (Gootz, 2004; Wellington & Curran, 2004).

Les cefalosporines de quarta generació (cefepima i cefpiroma) tenen un espectre equivalent al de les anteriors, amb dos característiques addicionals: (i) són més actives

INTRODUCCIÓ

front a *Ps. aeruginosa*, i (ii) són més resistents a l'acció de beta-lactamases. Són eficaces en soques resistents a les cefalosporines, incloses en els subgrups anteriors. La ceftazidima ocupa un lloc intermedi entre les cefalosporines de 3^a i 4^a generació, ja que encara que formalment se la sol incloure entre les de 3^a generació, la seva potent activitat anti-*Pseudomonas* suggereix una clara diferència respecte a la majoria de les incloses en aquest grup (Yahav *et al.*, 2007; Cuéllar, 2011).

(v) *Cefalosporines actives sobre anaerobis* (cefoxitina). Tenen una activitat relativament alta sobre anaerobis, tant Gram-positius com Gram-negatius, i sobre Gram-negatius aerobis. L'acció sobre Gram-positius aerobis és més modesta. Tots els antibiòtics del grup són equivalents (Cuéllar, 2011).

3. Monobactames

L'únic fàrmac és l'aztreonam. Estructuralment disposa d'un sol anell (el propi beta-lactàmic), unit a l'àcid sulfònic; la cadena lateral és idèntica a la de ceftazidima, motiu pel qual tenen un espectre antibacterià molt paregut, encara que amb menor potència anti-*Pseudomonas*, i sense activitat front a Gram-positius i anaerobis. No té resistència encreuada amb la resta dels beta-lactàmics, ni cap hipersensibilitat creuada amb ells. La seva aplicació terapèutica no es correspon, per tant, amb els beta-lactàmics, si no que té les aplicacions típiques dels aminoglucòsids, amb l'inconvenient de que la total absència d'acció front a Gram-positius i anaerobis obligui a utilitzar amb freqüència teràpies combinades, quan es sospiti mescla de patògens o possibilitat de superinfeccions (Cuéllar, 2006, 2011; Hutchinson *et al.*, 2013).

4. Carbapenems

Els carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem i doripenem) deriven d'altra modificació química de l'anell beta-lactàmic, en el que un àtom de sofre (S) ha sigut substituït per altre de carboni (C). Les seues múltiples peculiaritats químiques fan que aquest grup tingui un dels espectres antibacterians més amplis dels que es coneixen, sols comparable amb les més potents fluoroquinolones, ja que es troben entre els antibiòtics de major espectre d'acció disponibles, sent efectius front bacteris Gram-positius i Gram-negatius, tant aerobis com anaerobis (Zhanel *et al.*, 2005; Keam, 2008; Bassetti *et al.*, 2009). Bona part d'això es deu a la resistència front a les penicil·linases i cefalosporinases, encara que s'ha observat una ràpida evolució i expansió de carbapenemases entre els

enterobacteris (Gootz, 2004; Cantón *et al.*, 2012; Logan, 2012; Lynch *et al.*, 2013; Nordmann, 2014).

Els inconvenients dels carbapenems són: (i) una farmacocinètica desfavorable, que obliga a l'ús per via intravenosa, i (ii) la inducció de resistències, no sol al propi antibiòtic (especialment freqüents en *Ps. aeruginosa*), ja que són també potents inductors de beta-lactamases, inclòs sent insensibles (Brink *et al.*, 2004).

1.1.3.2. Antibacterians quinolònics

La història dels antibacterians quinolònics s'inicia en 1962, quan es va descriure per primera vegada l'àcid nalidíxic, considerat com el referent del grup. Les quinolones són antibacterians sintètics que es caracteritzen per la presència de l'àcid 4-quinolona-3-carboxílic (Drlica *et al.*, 2008; Cuéllar, 2011).

Les quinolones simples (àcid nalidíxic, oxolínic, pipemídic, etc.) constitueixen la primera generació d'aquest grup. Aquesta generació és eficaç front a els bacteris Gram-negatius aerobis, fonamentalment enterobacteris. Un segon grup està constituït per les fluoroquinolones, per la introducció d'un àtom de fluor en posició 6 de l'anell quinolònic (norfloxacino, ciprofloxacino, enoxacino, ofloxacino, etc.) (Fig. 1.10), que apareixen en els anys vuitanta, amb un espectre antibacterià molt ampli i amb elevada activitat front a la majoria dels enterobacteris, molts bacils Gram-positius (*H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*), cocs Gram-negatius (*Neisseria*), micobacteris, estafilococs i *Pseudomonas*. Posteriorment han aparegut noves quinolones que mantenen les característiques de les anteriors, però a més són més actives front a Gram-positius i anaerobis.

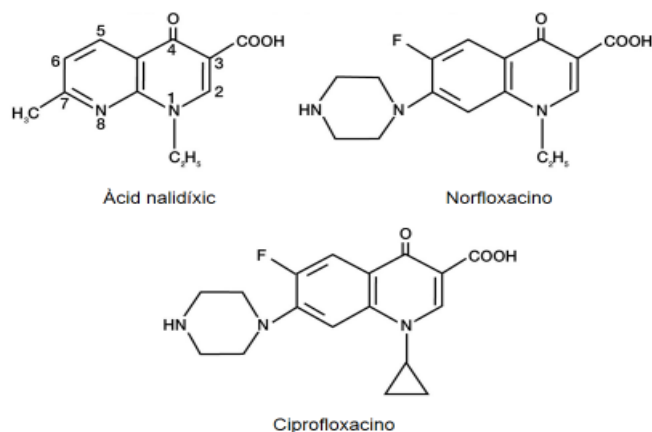


Fig 1.10. Estructura dels antibacterians quinolònics (modificat de Willey *et al.*, 2009).

INTRODUCCIÓ

Les molècules de referència en el grup són ciprofloxacino i ofloxacino. El levofloxacino és enantiòmer de l'ofloxacino, i resulta dos vegades més potent que la mescla racèmica. El norfloxacino està classificat com antiinfecció urinari, encara que també resulta útil en infeccions gastrointestinals. El moxifloxacino ha sigut un dels últims en incorporar-se al grup, precisa d'una única dosi diària i té una activitat significativa front a bacteris Gram-positius, superiors als anteriors del grup. També cal destacar el lomefloxacino, agent antibacterià utilitzat en quadres infecciosos oftalmològics superficials, amb major biodisponibilitat ocular del producte amb relació a altres fluoroquinolones i menor tendència a generar resistències (Zaragoza *et al.*, 2006; Amsden *et al.*, 2010; Mandell *et al.*, 2010; Van Bambeke, 2014).

Mecanisme d'acció

Les quinolones interfereixen la replicació de l'ADN bacterià al impedir el funcionament d'algun dels enzims implicats en la mateixa, l'ADN girasa (o topoisomerasa II) i la topoisomerasa IV. L'ADN cromosomal es troba en una conformació superenrotllada, i sols pot ser copiat o duplicat amb una modificació sobre la conformació total gràcies al concurs de diversos enzims. Les quinolones interfereixen amb l'ADN girasa bacteriana (Fig. 1.11), responsable del superenrotllament, el tall i el tancament de l'ADN bacterià, procés fonamental per la replicació de l'ADN. L'ADN girasa està composta per quatre subunitats iguals dos a dos (A₂B₂). La unió amb l'ADN es produeix a través del grup 4-hidroxi de la tirosina 122 de la subunitat A de l'ADN girasa, responsable del tall de la cadena d'ADN, formant un triple complex ADN-enzim-quinolona que actua bloquejant el procés de replicació de l'ADN. Encara que les cèl·lules eucariotes contenen un enzim que compleix una funció equivalent, són necessàries concentracions 100 vegades majors per a que sigui inhibida. S'ha suggerit que en bacteris Gram-negatius la topoisomerasa que inhibeix principalment és l'ADN girasa, mentre que en Gram-positius la diana fonamental és la topoisomerasa IV. A més, l'efecte inhibidor sobre la topoisomerasa II de cèl·lules eucariotes d'algunes de les noves quinolones ofereix un potencial efecte antitumoral (Drlica *et al.*, 2008; Cuéllar, 2011; Van Bambeke, 2014).

Mecanismes de resistència bacteriana

La resistència a les quinolones es desenvolupa fonamentalment per dos mecanismes: (i) mitjançant mutacions en el gen que codifica la subunitat A de la girasa, alterant l'enzim, i

(ii) mitjançant una disminució de la permeabilitat de la membrana bacteriana al fàrmac, probablement per modificació dels lipopolisacàrids de la membrana cel·lular.

El ràpid desenvolupament de resistències front a la primera generació de quinolones va suposar una limitació a la seva utilització. S'ha observat l'aparició de resistència creuada entre les quinolones de primera generació, i el mateix succeeix amb les fluoroquinolones, però no pareix que entre els dos grups existeixca, ni amb altres antimicrobians. Existeix una preocupació creixent sobre l'ús extensiu de les fluoroquinolones, que pot arribar a convertir-se en mal ús, i generar l'aparició de resistències en *S. pneumoniae*, *Enterobacteriaceae* i *Ps. aeruginosa* (Collignon & Angulo, 2006; Redgrave *et al.*, 2014; Kim & Hooper, 2014).

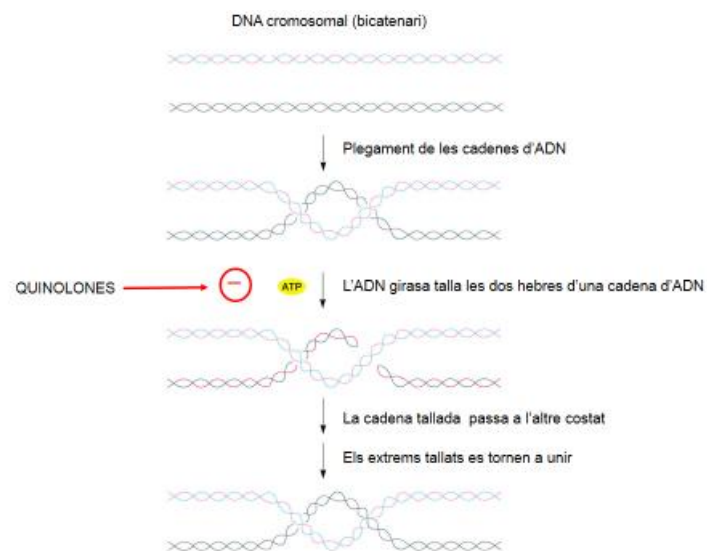


Fig. 1.11. Mecanisme d'acció de les quinolones (Willey *et al.*, 2009).

Espectre antibacterià

Com ja s'ha dit anteriorment, les fluoroquinolones disposen d'un ampli espectre d'activitat antibacteriana, que inclou tant bacteris Gram-positius com Gram-negatius (Drlica *et al.*, 2008; Cuéllar, 2011; Kim & Hooper, 2014; Van Bambeke, 2014).

1.1.3.3. Antibacterians macròlids

Els macròlids són antibiòtics de naturalesa lipídica produïts per bacteris del gènere *Streptomyces* o *Micromonospora*. El primer macròlid, l'eritromicina, es va obtenir en 1952 per McGuire a partir d'una soca de *Saccharopolyspora erythraea* (originalment *Streptomyces erythraeus*) aïllada de mostres ambientals. Més recentment s'han desenvolupat compostos derivats estructuralment de l'eritromicina, que presenten major espectre d'activitat, millors característiques farmacocinètiques i millors efectes secundaris. Els cetòlids són un subgrup de macròlids estructuralment relacionats amb l'eritromicina. En l'actualitat, la telitromicina és l'únic component del grup (hi han altres derivats, com la cetroamicina, que es troben en fase avançada d'investigació) (Scheinfeld, 2004; Clay *et al.*, 2006; Loza *et al.*, 2006; Cuéllar, 2011).

Els macròlids es caracteritzen químicament per presentar una estructura d'ester cíclic (lactona) que forma un anell complex amb un elevat nombre d'enllaços, generalment 14 o 16 (Fig. 1.12), encara que en alguns casos, com la virginiamicina, arriba a 22. D'ells, els que més èxit han tingut en el desenvolupament clínic en medicina humana han sigut els macròlids de 14 enllaços, mentre que alguns macròlids de major ordre s'utilitzen en medicina veterinària (virginiamicina, per exemple). A més del característic anell macrolactònid, els antibacterians d'aquest grup contenen, al menys, dos restes de sucre. Un d'ells és la desosamina, un dimetilaminosucre present en tots els macròlids; l'altre és la cladinosa, que es troba parcialment substituïda en els macròlids de 16 enllaços (Loza *et al.*, 2006; Cuéllar, 2011).

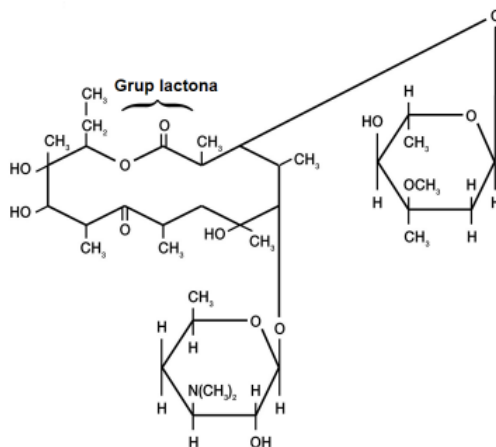


Fig. 1.12. Estructura de l'eritromicina (modificat de Willey *et al.*, 2009).

La molècula d'eritromicina en un entorn àcid (com succeeix en l'estómac), pot experimentar un procés d'acetalització amb la formació de derivats acetàtics que determina, per una banda, la degradació prematura d'una part de l'eritromicina administrada per via oral i, per altra banda, l'aparició dels molestos efectes adversos digestius. No obstant, no tots els efectes adversos gastrointestinals lligats a l'administració oral d'eritromicina es deuen a la formació de derivats acetàtics, si no a efectes locals inespecífics sobre la flora intestinal, tal com ocorre amb altres antibiòtics, derivats o no de l'eritromicina. La claritromicina, azitromicina, roxitromicina i diritromicina presenten modificacions químiques respecte de la molècula d'eritromicina que eviten la formació dels derivats acetàtics (Amsden *et al.*, 2010; Cuéllar, 2011).

La telitromicina forma part d'un subgrup específic dins dels macròlids, conegut com cetòlids. Aquest grup és menys sensible a la degradació pel pH àcid i també menys susceptible a l'expulsió del bacteri mitjançant mecanismes de bombeig (una forma de resistència freqüent, per exemple, en *S. pyogenes*), i té reduïda la seva capacitat inductora de la metiltransferasa bacteriana que impedeix la seva acció en el ribosoma (Scheinfield, 2004; Clay *et al.*, 2006).

Mecanisme d'acció

Els macròlids inhibeixen la síntesi proteica mitjançant la seva unió reversible a la subunitat 50S del ribosoma, això provoca un bloqueig de la transpeptidació i probablement de la translocació (Fig. 1.13). D'aquesta forma s'impedeix l'elongació de la cadena peptídica durant la síntesi de proteïnes. L'eritromicina és un antibiòtic fonamentalment bacteriostàtic i sol és bactericida a altes concentracions, sobre bacteris en fase de creixement i en situacions de baix inòcul bacterià.

Els cetòlids tenen major afinitat que la resta dels macròlids pels ribosomes, i a més han demostrat un significatiu efecte inhibitori en la formació de les subunitats 50S del ribosoma. A més, determinats macròlids, com l'eritromicina, la roxitromicina i l'azitromicina, han mostrat certs efectes positius sobre les cèl·lules del sistema immunològic, afectant als processos inflamatoris que es produeixen durant el curs d'una infecció i que poden afavorir l'activitat quimiotàctica dels macròfags i estimular la seva funció fagocítica. També s'ha demostrat que poden interferir amb la síntesi d'interleucines (IL), disminuint la producció de IL-8 i augmentant la producció de IL-10. Els macròlids de 14 i 15 àtoms també poden bloquejar la producció de determinades tòxines bacterianes

INTRODUCCIÓ

que confereixen virulència als microorganismes, entre ells *Ps. aeruginosa* (Loza *et al.*, 2006; Cuéllar, 2011; Van Bambeke, 2014).

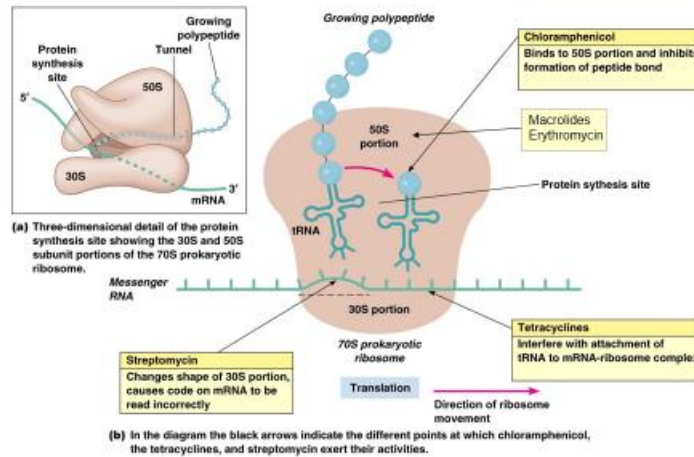


Fig. 1.13. Antibiòtics que actuen a nivell del ribosoma 70S (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

Mecanisme de resistència

La majoria dels bacteris Gram-negatius són intrínsecament resistent als macròlids i lincosamides, ja que aquests antimicrobians són hidrofòbics i excessivament voluminosos per a poder travessar la membrana externa de les espècies Gram-negatives. En quant als microorganismes Gram-positius, la resistència a l'eritromicina de *S. aureus* i estafilococs coagulasa negatiu va ser considerada irrellevant durant molts anys. No obstant, degut a la utilització massiva dels macròlids, aquesta resistència ha anat augmentant i actualment afecta també a altres espècies, com *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *H. pylori*, etc., degut sobre tot a la disseminació interespecie de determinants de resistència, dels que el principal reservori són els estafilococs coagulasa negatiu.

Es coneixen diversos mecanismes de resistència adquirits, comuns per a tots els grups (Klugman & Lonks, 2005; Roberts, 2008; Cuéllar, 2011; Principi & Esposito, 2013), que globalment es poden classificar en tres tipus:

1. *Alteracions en la diana o lloc d'actuació de l'antibiòtic.* No és un mecanisme únic, ja que pot deure's a:

- (i) Metilació de l'ARNr: és el mecanisme de resistència més prevalent per a macròlids i lincosamides. Es deu a l'adquisició de gens (*erm*) que codifiquen la síntesi

d'una metilasa o metiltransferasa que metila la subunitat 23S de l'ARN ribosòmic. Existeixen més de 30 tipus de gens *erm* àmpliament distribuïts entre nombroses espècies de microorganismes Gram-positius com estafilococs, estreptococs, enterococs, lactobacils, i també en alguns Gram-negatius, entre els que destaca el gènere *Bacteroides*.

(ii) Mutacions en l'ARNr 23S: que modifiquen la seqüència i disminueixen la seva afinitat pels macròlids. Es troben en *H. pylori*, *H. influenzae*, *Mycoplasma* i *Mycobacterium*. Afecta als macròlids i lincosamides, però no als cetòlids. Aquest tipus de resistència és molt rara en *S. pneumoniae*.

(iii) Mutacions en les seqüències corresponents a les proteïnes ribosomals: si aquestes mutacions afecten a la proteïna L4, hi ha resistència de baix nivell als macròlids, però no a les lincosamides i els cetòlids. Si afecta a la proteïna L22, la resistència és de baix nivell als macròlids, als cetòlids i a les lincosamides. Aquest tipus de resistència s'ha descrit en estreptococs i *H. influenzae*.

(iv) Xicotets pèptids o fragments d'ARNr que s'insereixen en la seqüència aminoacídica ribosòmica i impedeixen la unió de l'antibiòtic amb la subunitat 50S ribosomal.

2. *Increment dels processos d'eixida de l'antibiòtic (bombes d'expulsió o eflux)*. En Gram-positius l'expressió de les bombes d'expulsió que confereixen resistència als macròlids es induïda per l'exposició del bacteri a l'antibiòtic.

3. *Inactivació de l'antibiòtic per enzims modificadors*. S'ha identificat en lactobacils, enterobacteris, *Ps. aeruginosa* i estafilococs. L'anell lactona dels macròlids de 14 àtoms pot ser inactivat per esterases, glicosilases o per fosfotransferases que es troben a l'espai periplàsmic del bacteri; la clindamicina o lincomicina i altres grups es modifiquen per nucleotidiltransferases. Amb freqüència, els seus determinants genètics es localitzen en plasmidis. La transcendència clínica d'aquest mecanisme de resistència és molt escassa.

Espectre antibacterià

L'espectre d'activitat compren els cocs Gram-positius i Gram-negatius, els bacils Gram-positius del gènere *Corynebacterium* i certs bacils Gram-positius de creixement anaeròbic (Cuéllar, 2011). És per tant, activa sobre *S. pneumoniae*, els estreptococs beta-hemolítics (*S. pyogenes* i *S. agalactiae*), estafilococ i *Listeria* spp., *M. catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter* spp., i *H. pylori*. El seu espectre inclou també a *M. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia*

INTRODUCCIÓ

trachomatis, i *Ureaplasma urealyticum*. Els bacils Gram-negatius (enterobacteris, *Ps. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp.), entre altres, són intrínsecament resistents.

En Espanya, les freqüències de resistència als macròlids en els bacteris Gram-positius causants d'infeccions respiratòries són altes. En *S. pneumoniae* el nombre d'aïllaments resistents a l'eritromicina ha experimentat un progressiu increment, assolint xifres tan preocupants com el 35%. Les xifres de resistència en *S. pyogenes* són igualment molt elevades, superant el 24% dels aïllats clínics en el nostre país. Al contrari que en *S. pneumoniae*, el mecanisme de resistència es degut majoritàriament a la presència de bombes d'expulsió. No s'han descrit aïllaments resistents de *L. pneumophila* i *C. pneumoniae* als macròlids, i en *M. pneumoniae* són molt escassos. El 20% dels estafilococs són resistents a l'eritromicina, degut essencialment a la producció de metilasa. En el cas concret de *S. aureus* resistent a la meticil·lina, la freqüència de resistència a l'eritromicina es situa per damunt del 80%. En *H. pylori*, la resistència a la claritromicina en Espanya és d'un 10% dels aïllaments. En aquest cas, la resistència es deguda a mutacions en l'ARNr 23S que afecten a l'afinitat de la claritromicina per la seva diana d'actuació. Els macròlids tenen una activitat residual sobre micobacteris, sent la claritromicina el compost més actiu. L'espectre d'activitat dels cetòlids és pràcticament idèntic al dels macròlids (Klugmann & Lonks, 2005; Cuéllar, 2011; Principi & Exposito, 2013; Van Bambeke, 2014).

1.1.3.4. *Lincosamides (lincosànids)*

És un grup format per la clindamicina i la lincomicina. Estructuralment presenten, com element més significatiu, un tiosucre lligat a un aminoàcid (prolina). La lincomicina es va aïllar en 1953, a partir de cultius de *Streptomyces lincolnensis*. Quatre anys més tard es va obtenir per semisíntesi la clindamicina (7-desoxi-7-clorolincomicina). Aquesta última ha eclipsat clínicament a la lincomicina, degut a la major activitat antibiòtica, a la menor toxicitat i al millor perfil farmacocinètic (Loza *et al.*, 2006; Amsden *et al.*, 2010; Mandell *et al.*, 2010; Cuéllar, 2011).

El mecanisme d'acció de les lincosamides és igual que el dels macròlids i el del cloramfenicol, a nivell de la subunitat 50S del ribosoma bacterià, inhibint la síntesi de proteïnes al impedir l'elongació per interferència amb l'enzim peptidil-transferasa. El lloc d'unió a la subunitat 50S del ribosoma es solapa amb el del cloramfenicol i els macròlids, per això no deuen administrar-se conjuntament amb aquests últims.

La clindamicina pot ser bactericida o bacteriostàtica dependent de la concentració del fàrmac, l'espècie bacteriana considerada i l'inòcul bacterià. Respecte a l'espectre

antibacterià, la clindamicina actúa fonamentalment sobre bacteris Gram-positius, degut a que és una molècula molt hidròfila, i això dificulta molt la seva difusió a través de la membrana bacteriana externa de les espècies Gram-negatives. Un dels aspectes més valorats del seu espectre antibacterià és l'activitat sobre les espècies anaeròbiques (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, etc.). És també efectiu en estreptococs del grup A, neumococs i estafilococs, inclosos els productors de penicil·lina. No obstant, molts d'aquests microorganismes anaerobis han desenvolupat mecanismes de resistència a la clindamicina. Aquesta resistència varia considerablement d'unes espècies a altres. En els cocs Gram-positius anaerobis, el mecanisme de resistència consisteix en la producció de la metilasa i assolís valors del 20%. En *Bacteroides fragilis*, els aïllaments resistents a la clindamicina (i també a l'eritromicina) s'han anat incrementant progressivament, amb freqüències del 25%. La resistència és també deguda a la metilasa. Altres microorganismes són intrínsecament resistents, com els bacteris Gram-negatius aerobis i anaerobis facultatius (Roberts, 2008; Cuéllar, 2011).

1.1.3.5. Cloramfenicol

El cloramfenicol es va obtenir inicialment a partir de cultius de *Streptomyces venezuelae*, encara que actualment s'obté per síntesi química. Al igual que els macròlids, aquest antibiòtic s'uneix a l'ARNr 23S de la subunitat ribosomal 50S, i inhibeix la reacció de la peptidil-transferasa, bloquejant per tan la síntesi proteica. El cloramfenicol té un espectre d'acció molt ampli, però malauradament és prou tòxic. Causa amb freqüència significativa reaccions al·lèrgiques o neurotòxiques, encara que l'efecte secundari més freqüent és l'alteració de la funció de la medulla òssia, el que causa anèmia aplàsica i disminució del nombre de leucòcits. Per tant, el seu ús està restringit a casos particulars, quan la vida del pacient està en perill i no hi ha tractaments alternatius. Els principals mecanismes de resistència al cloramfenicol són la modificació de la molècula per acció de l'enzim cloramfenicol-acetiltransferasa o per mutacions en la seva diana (ARNr 23S) (Núñez, 2006; Civljak *et al.*, 2014).

1.1.3.6. Tetraciclines

El primer membre d'aquest grup d'antibiòtics, la clortetraciclina, es va aïllar en 1948, a partir de cultius de *Streptomyces aureofaciens*. Posteriorment, en 1950, es va descobrir un antibiòtic relacionat, l'oxitetraciclina, en aquest cas, a partir de cultius de *Streptomyces rimosus*. En 1953 s'obtidria la molècula de la que deriven els dos anteriors antibiòtics, la

INTRODUCCIÓ

tetraciclina, mitjançant un procés químic d'hidrogenació de la clortetraciclina. Posteriors processos de semisíntesi van portar a la minociclina i la doxiciclina. L'últim membre d'aquesta classe és la tigeciclina, comercialitzada en 2006. Des del punt de vista estructural, les tetraciclines es caracteritzen per la presència d'un nucli naftafènic, format per la condensació de quatre anells benzènics (d'on deriva el terme tetraciclina, Fig. 1.14) (Frampton & Curran, 2005; Núñez, 2006; Stein & Craig, 2006; Zhanel *et al.*, 2006; Vicente & Pérez-Trallero, 2010; Nguyen *et al.*, 2014).

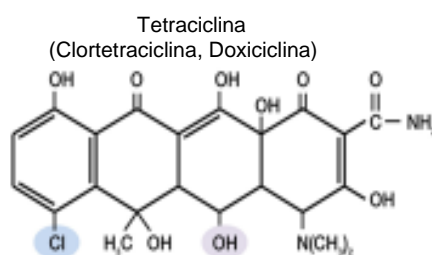


Fig. 1.14. Estructura de les tetraciclines (modificat de Willey *et al.*, 2009).

Mecanisme d'acció

Les tetraciclines actuen bloquejant la síntesi proteica bacteriana en les primeres fases de l'elongació. Concretament, s'uneixen al lloc A de la subunitat 30S del ribosoma, impedit amb això que pugui accedir l'aminoacil-ARNt (Nguyen *et al.*, 2014). Amb això s'impedeix la incorporació de nous aminoàcids a la cadena proteica en formació. Tot això causa una acció predominantment bacteriostàtica.

Donat que les tetraciclines, com la resta d'antibiòtics inhibidors de la síntesi proteica, actuen intracel·lularment, deuen travessar les capes externes del bacteri: paret i membrana. En les espècies bacterianes Gram-negatives, les tetraciclines travessen la membrana externa a través de porus hidrofílics. Per aquest motiu, variacions en la lipofília/hidrofília de les distintes tetraciclines poden afectar al seu espectre d'acció; la doxiciclina i la minociclina difondeixen molt millor que els seus congèneres en les espècies Gram-negatives, d'aquí que presenten un espectre antibacterià més ampli (especialment sobre Gram-negatius).

Mecanismes de resistència

El mecanisme de resistència més comú consisteix en evitar l'acumulació intracel·lular de l'antibiòtic, per reducció de la permeabilitat de la coberta bacteriana a l'antibiòtic o,

més freqüentment, per bombeig actiu (eflux), facilitant l'expulsió de l'antibiòtic. Aquest mecanisme pot conferir resistència a les tetraciclins de forma natural o adquirida com conseqüència de mutacions (en les porines i/o en les proteïnes d'expulsió o eflux) o per la presència d'un factor de resistència mediat per plasmidis (bombes d'eflux). Sol haver resistència creuada entre les tetraciclins, amb excepció de la minociclina, que pot ser activa front a bacteris que han presentat previament resistència a altres tetraciclins (Nguyen *et al.*, 2014).

Altre mecanisme freqüentment involucrat en la resistència adquirida es deu a proteïnes de protecció ribosomal, que permeten actuar a l'aminoacil-ARNt en presència de concentracions d'antibiòtic que normalment inhibirien la síntesi de proteïnes. El bombeig actiu i la protecció de la inhibició del ribosoma són mecanismes de resistència clínicament rellevants. Altra forma de resistència a tetraciclins amb escassa transcendència clínica i de freqüència excepcional és mitjançant la inactivació enzimàtica, observada en alguns bacteris anaerobis (Nuñez, 2006; Vicente & Pérez-Trallero, 2010; Cuéllar, 2011; Nguyen *et al.*, 2014).

Existeixen molts gens de resistència a les tetraciclins. Un gran nombre d'ells s'associen als elements mòbils, ja sigui en forma de plasmidis, de transposons o d'integrans. En els integrans, junt al gen que confereix la resistència a tetraciclins, s'observen amb freqüència altres gens que confereixen resistència creuada a altres antibiòtics, per el que aquestes soques multiresistents poden ser seleccionades per les tetraciclins o per altres antimicrobians. Algunes aplicacions terapèutiques de les tetraciclins s'han vist limitades per l'aparició de soques resistents, especialment de *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* i *N. gonorrhoeae* (Nguyen *et al.*, 2014; Cuéllar, 2011).

Espectre antibacterià

En general, les tetraciclins presenten un espectre antibacterià relativament ampli, incloent espècies Gram-positives i Gram-negatives, aeròbies i anaeròbies, espiroquetes, micoplasmes, clamidies i rickettsies. Tanmateix, moltes de les espècies bacterianes que foren inicialment sensibles a les tetraciclins més antigues no ho són en l'actualitat, al tornar-se resistents fonamentalment degut a la producció de proteïnes que transporten a l'antibiòtic fora de la cèl·lula (bombes d'eflux) (Cuéllar, 2011).

La tigeiclina té un espectre antibacterià relativament ampli, encara que és un poc més activa front a cocs Gram-positius que front a bacils Gram-negatius. És capaç d'evitar el mecanisme de resistència bacteriana a les primeres tetraciclins, basat en la producció

INTRODUCCIÓ

bacteriana de bombes d'eflux, així com alguns altres mecanismes secundaris de resistència, tal com el de protecció ribosomal. No obstant, no evita l'acció de certes bombes d'eflux multifàrmac codificades per gens cromosòmics, com les de *Proteus* i *Pseudomonas* (Frampton & Curran, 2005; Stein & Craig, 2006; Zhanel *et al.*, 2006).

1.1.3.7. Aminoglucòsids

L'estreptomina va ser el primer aminoglucòsid que es va descobrir. Waksman va aïllar l'estreptomina en 1944, a partir de cultius de *Streptomyces griseus*. Posteriorment, el mateix Waksman va aïllar a partir de cultius de *Streptomyces fradiae* els aminoglucòsids derivats de la desoxiestreptamina. Estructuralment estan formats per dos restes d'aminosucres enllaçats a través d'altre sucre o de ciclitol (Fig. 1.15). Els aminoglucòsids poden ser classificats estructural i farmacològicament en tres grups (Pancoast, 1988; Edson & Terrell, 1999; Palomino & Pachón, 2003; Núñez, 2006, Cuéllar, 2011):

- (i) Derivats de l'estreptidina (estreptomina).
- (ii) Derivats de la 2-desoxiestreptamina:
 - a) Kanamicines (amikacina, kanamicina, tobramicina)
 - b) Gentamicines (gentamicina, netilmicina, sisomicina)
- (iii) Aminociclitols purs (spectinomicina).

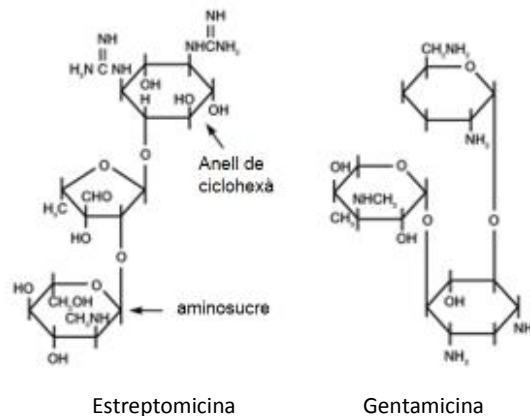


Fig. 1.15. Estructura dels antibacterians aminoglucosídics (modificat de Willey *et al.*, 2009).

Mecanisme d'acció

Els aminoglucòsids actuen unint-se a la subunitat 30S dels ribosomes bacterians, provocant una lectura errònia de l'ARNm. Açò condueix a que el ribosoma incorpore un

aminoàcid inadequat (no codificat en l'ARNm) en la proteïna en formació, i per tant les proteïnes formades són anòmales i manquen d'utilitat pel bacteri. L'estreptomicina actua de forma sinèrgica amb les penicil·lines front a la majoria dels estreptococs i enterococs. A canvi, és el més ototòxic dels aminoglucòsids (Edson & Terrell, 1999; Palomino & Pachón, 2003; Núñez, 2006).

Mecanisme de resistència

La resistència adquirida als aminoglucòsids es deu a tres mecanismes bàsics:

(i) *Enzims que modifiquen aminoglucòsids*. És el mecanisme més important i el millor estudiat. Ha sigut detectat en diferents bacils Gram-negatius, en *S. aureus* i en *Enterococcus* spp. Es tracta de diversos enzims (acetilases, adenilases i fosfatases) que modifiquen la molècula, generant molècules de baixa afinitat pel ribosoma bacterià. Naturalment, quant major és el nombre d'enzims que poden actuar sobre la mateixa molècula, tant major és la probabilitat de trobar soques resistents. Alguns enzims bacterians tenen doble capacitat funcional i poden ser, per exemple, fosforilants i acetilants a la vegada, conferint resistència en *S. aureus* front a la gentamicina i altres aminoglucòsids. Els aminoglucòsids més importants poden ser inactivats per acetilació mitjançant acetiltransferases produïdes especialment per bacils Gram-negatius. Els gens que codifiquen per aquests enzims poden ser adquirits d'altres bacteris per plasmidis o per fragments d'ADN en forma de transposons, que permet la transferència dels mateixos a altres bacteris. La gentamicina i la tobramicina poden inactivar-se al menys per 5 o 6 enzims, i l'habitual és que es troba resistència creuada entre les dos. L'amikacina s'inactiva únicament per un enzim, pel que la majoria dels enterobacteris resistents a la gentamicina i la tobramicina són sensibles a l'amikacina (Palomino & Pachón, 2003; Núñez, 2006; Cuéllar, 2011).

(ii) *Disminució de l'entrada a l'interior cel·lular*. Aquest mecanisme s'ha observat en *Ps. aeruginosa*. Apareix en bacteris que sobreviuen després de l'exposició a concentracions d'antibiòtic menors que la CMI. S'ha demostrat clínicament que el tractament amb dosis elevades d'aminoglucòsids, per aconseguir un quocient concentració màxima plasmàtica (C_{màx})/CMI superior a 10, ajuda a evitar aquesta resistència, al assolir un major efecte bactericida inicial i al suprimir la supervivència dels mutants. L'associació d'antibiòtics que actuen a nivell de la paret cel·lular, com les penicil·lines, i la teràpia amb aminoglucòsids pot incrementar l'entrada de l'aminoglucòsid a l'interior del bacteri, augmentant així l'eficàcia de l'acció antimicrobiana.

(iii) *Alteracions en els llocs d'unió al ribosoma.* Els canvis en la composició de la proteïna receptora en el ribosoma 30S tenen menor importància clínica. Aquests canvis, algunes vegades en un sol aminoàcid de la proteïna ribosomal, poden ocórrer per mutació. Un percentatge significatiu de soques d' *Enterococcus faecalis* són resistents a l'estreptomicina degut a aquest mecanisme. En aquests casos, no hi ha sinèrgia entre penicil·lines i aminoglucòsids. També s'ha trobat aquest mecanisme en *E. coli* i *N. gonorrhoeae*.

Espectre antibacterià

El principal camp d'aplicació és el tractament d'infeccions per bacils Gram-negatius aerobis. Els aminoglucòsids tan sol travessen la paret cel·lular quan existeix oxigenació activa i, per tant, són ineficaços contra Gram-negatius anaerobis. Els anaerobis facultatius són també molt resistents quan viuen en condicions de carència d'oxigen. La majoria dels Gram-positius tampoc són sensibles. Els antibiòtics que alteren la paret cel·lular faciliten la penetració de l'aminoglucòsid, generant la coneguda sinèrgia entre antibiòtics beta-lactàmics (penicil·lines i cefalosporines actives contra Gram-negatius), o carbapenèmics, i els aminoglucòsids.

Els aminoglucòsids són actius front a la majoria d'espècies d'enterobacteris i *Pseudomonas*. La gentamicina, la tobramicina i l'amikacina tenen una activitat similar. L'estreptomicina, la kanamicina i l'amikacina són actives front a *M. tuberculosis*. La tobramicina és freqüentment més activa que la gentamicina front a *Ps. aeruginosa*, amb escassa activitat sinèrgica front a enterococs. L'amikacina és l'aminoglucòsid més actiu en el tractament sinèrgic front a enterococs, i la gentamicina ho és front a *Serratia*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, i *B. fragilis*, mentre que quasi tots els bacteris Gram-negatius anaerobis solen ser resistents (Edson & Terrell, 1999; Palomino & Pachón, 2003; Núñez, 2006; Cuéllar, 2011).

1.1.3.8. Antibiòtics peptídics

Inclou a un conjunt heterogeni d'antibacterians que presenten com a nexa d'unió la presència d'una cadena peptídica en la seva estructura química. Els grups més rellevants es descriuen a continuació.

(i) Antibiótics glucopeptídics

Són antibiòtics amb acció bactericida que actuen interferint la formació de la paret bacteriana (peptidglucà o mureïna). La incidència de resistència específica a ells era molt baixa fins fa alguns anys, però el seu creixent ús ha condicionat l'aparició de resistències en enterococs i estafilococs. Són substàncies actives front a Gram-positius aerobis i anaerobis però no front a Gram-negatius. Presenten un efecte sinèrgic amb els aminoglucòsids, amb els que s'associen amb freqüència.

La vancomicina i la teicoplanina formen part d'un grup d'antibiòtics genèricament anomenats glucopeptídics, degut a la presència d'un sucre (aminosucre), unit a un sistema de tres anells aromàtics, i també hi ha una cadena peptídica simple i un sistema de bis-resorcinol (Van Bambeke *et al.*, 2004).

El mecanisme d'acció d'aquests antibiòtics recorda en part al dels beta-lactàmics, ja que actuen interferint amb els processos de síntesi i reparació de la paret bacteriana, més concretament sobre el principal constituent estructural d'aquesta, el peptidglucà. Els antibiòtics glucopeptídics s'uneixen de forma selectiva a les unitats d'UDP-ANAM-pentapéptid, que contenen un reste de D-Ala-D-Ala, mitjançant el grup carboxílic lliure, amb el que provoquen una acumulació dels precursors UDP-N-acetilmuramilpèptid.

Tenen un espectre reduït (sols afecten a bacteris Gram-positius) i una toxicitat important, motiu per el que es reserven per les infeccions greus (endocarditis infecciosa, etc.) produïdes per bacteris resistents a beta-lactàmics, o en pacients al·lèrgics a aquests últims antibiòtics. S'utilitzen en el tractament d'infeccions per bacteris Gram-positius productors de beta-lactamases, en especial les ocasionades per estafilococs meticil·lina-resistents i altres casos de resistència múltiple a antibiòtics (Otto, 2012). No obstant, cal destacar que l'aparició de soques resistents d'enterococs i de *S. aureus* resistents a meticil·lina constitueix un important problema terapèutic. Hi ha varis mecanismes de resistència, entre els que cal destacar la modificació del extrem D-ala-D-ala del peptidglucà per D-ala-D-lactat (Linden, 2008; Guskey & Tsull, 2010; Henson *et al.*, 2015).

(ii) Daptomicina

La daptomicina no està relacionada ni química ni farmacològicament amb altres antibiòtics, encara que macromolecularment pot incloure's dins dels antibiòtics peptídics. La daptomicina va ser aïllada a partir de cultius de *Streptomyces roseosporus*. Estructuralment, es tracta d'un lipopèptid macrocíclic. Està format per 13 aminoàcids, que tenen una estructura de cicle, i amb una xicoteta cadena peptídica lateral, que conté un

INTRODUCCIÓ

grup N-decanoil (àcid greix). Aquesta cadena d'àcid greix és determinant per l'activitat antibacteriana, ja que sense ella l'estructura peptídica no té aquesta activitat.

És un antibiòtic que actua inserint-se directament dins de la membrana citoplasmàtica dels bacteris Gram-positius, tant aerobis com anaerobis, a través d'un procés que es dependent de la concentració de calci (Ca^{2+}). Com conseqüència d'això, es produeix una ràpida despolarització de la membrana bacteriana i l'eixida a l'exterior cel·lular d'ions potassi (K^+). Aquests canvis determinen una ràpida detenció dels processos de síntesi proteica i d'àcids nucleics (ADN i ARN el que provoca la mort del bacteri (Alder, 2005; Steenbergen *et al.*, 2005).

Degut al seu peculiar mecanisme, molt diferent del corresponent a altres antibiòtics actualment utilitzats en clínica, cap dels mecanismes implicats en la resistència a aquests antibiòtics pareix afectar a l'activitat de la daptomicina. Actua de forma exclusiva sobre bacteris Gram-positius, sent generalment susceptibles les següents espècies: *S. aureus* (incloent soques resistents a meticil·lina i vancomicina), *S. haemolyticus*, *Staphylococcus coagulasa negatiu*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. pyogenes* (incloent soques resistents a benzilpenicil·lina), *Streptococcus* del grup G, *Enterococcus* spp. (incloent soques resistents a vancomicina), *Clostridium perfringens* i *Peptostreptococcus* spp. (Alder, 2005; Steenbergen *et al.*, 2005; Cuéllar, 2011).

(iii) Polimixines

Són octapèptids d'alt pes molecular capaços d'alterar la membrana de bacteris Gram-negatius, produint un efecte bactericida. Sol s'utilitzen la polimixina B i la polimixina E o colistina, les dos per a ús tòpic. La colistina va ser introduïda per primera vegada en clínica en 1959. Actua de forma quasi exclusiva sobre bacteris Gram-negatius (Zavaski *et al.*, 2007; Velkov *et al.*, 2010; Biswas *et al.*, 2012; Velkov *et al.*, 2013).

(iv) Bacitracina

És una mescla d'antibiòtics polipeptídics aïllats a partir de cultius de *Bacillus subtilis*. S'utilitza exclusivament en formulacions tòpiques degut a la seva elevada ototoxicitat i neurotoxicitat, sent el principal component la bacitracina A. És eficaç especialment sobre bacteris Gram-positius, encara que també mostra certa activitat front a cocs anaeròbics, *Neisseria*, *Clostridium tetani* i *Corynebacterium diphtheriae*. Actua inhibint la biosíntesi de la paret bacteriana, al interferir amb la desfosforilació del C_{55} -undecaprenil-pirofosfat (bactoprenol). El bactoprenol permet el transport de substàncies que, com els sucres, són

hidrofíliques, i no podrien travessar per si mateixa la barrera hidrofòbica de la membrana plasmàtica, i participa en la translocació de les molècules precursors de la mureïna des del citoplasma a la part externa de la cèl·lula bacteriana, i per tant al no regenerar-se el bactoprenol per efecte de la bacitracina, es bloqueja la biosíntesi del peptidoglucà. S'han descrit alguns mecanismes de resistència a la bacitracina, com l'augment en la producció d'enzims (kinases) que fosforilen el bactoprenol, i sistemes d'expulsió (eflux), entre altres (Tsuda *et al.*, 2002; Cantón *et al.*, 2011; Cuéllar, 2011; Han *et al.*, 2015).

1.1.3.9. Oxazolidinones

El linezolid forma part de les piperazinil-feniloxazolidinonas, que és el grup de oxazolidinonas amb millors característiques per a convertir-se en útils antibacterians de tota la sèrie. El linezolid és el fàrmac d'aquest grup amb major aplicació terapèutica, i es considerat fonamentalment com un agent bacteriostàtic front a estafilococs i enterococs, però bactericida front a la majoria de les soques d'estreptococs. El linezolid actua específicament inhibint la iniciació de la síntesi proteica, al interferir de forma selectiva amb el procés de translació, que implica una interacció amb la subunitat 50S i, específicament, amb l'ARNr 23S. També es produeix, de forma secundària, una interacció amb la subunitat 30S. La unió del linezolid amb la subunitat 50S impedeix la unió de l'ARNt, encara que no l'activitat de l'enzim peptidil-transferasa (Núñez, 2006; Roberts, 2008; Cuéllar, 2011).

El linezolid és actiu de forma preferent sobre bacteris Gram-positius, estafilococs (incloent els resistents a meticil·lina), enterococs (incloent les soques resistents a vancomicina) i neumococs (incloent les soques resistents a penicil·lina). També presenta una bona activitat front a *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, *M. catarrhalis*, *C. pneumoniae* i micoplasmes. A més, desenvolupa un potent efecte front a anaerobis, tant Gram-positius com Gram negatius (com *Bacteroides* spp.). L'acció sobre Gram-negatius és molt més reduïda, exercint una activitat moderada front a *H. influenzae*, *Legionella* spp. i *Neisseria* spp. No té pràcticament activitat front enterobacteris i altres bacils Gram-negatius. Altre membre de les oxazolidinones, el tedizolid, també presenta una potencial aplicabilitat en la teràpia d'algunes infeccions bacterianes i té un efecte més potent sobre la síntesi proteica, ja que també inhibeix la peptidil-transferasa (Shaw *et al.*, 2008; Hall & Michaels, 2015).

El linezolid s'absorbeix en el tracte digestiu de forma ràpida i completa després de la seva administració oral. El linezolid presenta nombrosos efectes adversos que en ocasions

INTRODUCCIÓ

poden ser greus (hipertensió, diarrea, cefalea, nàusees, mielodepressió reversible, neuropatia perifèrica i òtica) pel que diverses agències han restringit la indicació del linezolid sols pel tractament d'infeccions complicades, en les que no hi ha altres alternatives terapèutiques (Cuéllar, 2011).

1.1.3.10. Nitroderivats

Els 5-nitroimidazols són un conjunt de substàncies actives front a certs protozous (tricomones, amebes, etc.) i bacteris anaerobis (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Helicobacter*, etc.). Estructuralment és un grup molt homogeni, el representant més conegut i simple és el metronidazol. Els nitroimidazols poden penetrar en la major part dels bacteris, però únicament són eficaços en aquells que produeixen nitroreductasa, enzim que genera, a partir del fàrmac, productes citotòxics de vida mitja curta que s'uneixen a l'ADN, provocant alteracions en la seva estructura i impeding la seva funció. Per aquest motiu, sol són efectius front microorganismes anaerobis estrictes i sobre alguns protozous. Aquests microorganismes disposen d'un potent sistema reductor, capaç de transformar el grup nitro (-NO₂) fins una funció amina (-NH₂), passant per diversos estats intermedis d'oxidació (radicals lliures, hidroxilamina, etc.) (Zaragoza *et al.*, 2006; Amsden *et al.*, 2010; Cuéllar, 2011).

La resistència als nitroimidazols pot ser innata, com en el cas dels bacteris aerobis (com no tenen nitroreductasa no són susceptibles a aquests fàrmacs), o adquirida, que es pot desenvolupar per: (i) disminució de la captació del fàrmac (impermeabilitat), (ii) disminució de producció de la nitroreductasa o modificació de les seues característiques. Els efectes adversos són generalment lleus i poc freqüents (alteracions digestives, genitourinàries i al·lèrgiques, entre altres menys freqüents) (Kwon *et al.*, 2001; Vicente & Pérez-Trallero, 2010; Cuéllar, 2011).

Els 2-nitrofurans estan molt pròxims química i farmacològicament al grup anterior. Actuen exclusivament sobre bacteris i el seu espectre comprèn espècies Gram-positives i Gram-negatives, encara que l'efecte és més marcat sobre aquestes últimes, en especial els enterobacteris. El mecanisme d'acció dels nitrofurans no ha sigut establert amb el mateix nivell de detall que el dels nitroimidazols, encara que el comportament químic i biològic pareix suggerir un mecanisme anàleg. També s'han apuntat altres possibles llocs d'actuació, com els processos enzimàtics implicats en la respiració cel·lular (oxido-reducció), el metabolisme glucídic i la biosíntesi de la paret bacteriana.

La nitrofurantoina va ser el primer d'aquests fàrmacs en introduir-se en terapèutica. S'utilitza en el tractament d'infeccions del tracte urinari, sent activa front a la major part dels enterobacteris i dels enterococs, però no front a *Ps. aeruginosa*. Mutacions en els gens de la nitroreductasa s'han descrit com a responsables de la resistència a nitrofurantoina (Koziazar *et al.*, 1998; Rafii & Hansen, 1998; James *et al.*, 2011).

Altre compost derivat del nitrofurà és la nitrofurazona, d'ampli espectre d'activitat antimicrobiana, però amb poca activitat front a *Pseudomonas* spp. És d'aplicació tòpica, i s'utilitza com antisèptic i desinfectant de ferides superficials i per la preparació d'intervencions quirúrgiques (Cuéllar, 2011).

1.1.3.11. Sulfamides i diaminopirimidines

La història de les sulfamides està lligada a les observacions dels efectes antimicrobians *in vitro* que manifestaven alguns colorants. En 1935 va començar l'era de les sulfamides, quan en Alemanya es va sintetitzar un colorant, la sulfamidocrisoidina, que s'anomenà comercialment Prontosil. Domagk va observar que la sulfamidocrisoidina exercia una clara protecció en les rates, contra la inoculació de dosis superiors a la letal de l'estreptococ beta-hemolític. Després estudis a l'Institut Pasteur de Paris van permetre concloure que el grup actiu era la sulfanilamida. A partir d'aquest moment van començar les modificacions estructurals del principi actiu que van generar els membres d'aquest grup d'antimicrobians (Fig. 1.16).

Les sulfamides bloquegen selectivament la dihidropteroat sintasa, enzim implicat en la síntesi d'àcid fòlic, que és un cofactor essencial per la síntesi de bases nitrogenades púriques i d'alguns aminoàcids, tant en les cèl·lules procariotes com en les eucariotes. Les sulfamides presenten una gran analogia química amb l'àcid p-aminobenzòic (PABA), actuant com un antimetabolit d'aquest últim, i causen l'inhibició competitiva de la biosíntesi d'àcid fòlic (Fig. 1.17) (Zaragoza *et al.*, 2006; Amsden *et al.*, 2010; Mandell *et al.*, 2010; Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

Molts bacteris són impermeables a l'àcid fòlic, motiu pel qual tenen que sintetitzar-lo intracel·lularment, a partir del PABA. Les sulfamides són selectivament tòxiques per a molts patògens ja que aquests bacteris sintetitzen el seu propi àcid fòlic i no poden captar de l'exterior aquest cofactor de forma eficaç, mentre que els éssers humans no sintetitzen àcid fòlic i l'han d'obtenir de la dieta. Per tant, les sulfamides tenen un elevat índex terapèutic.

INTRODUCCIÓ

Les sulfamides tenen un efecte antibacterià relativament ampli, encara que actualment abunden les soques resistents. La creixent resistència dels bacteris a les sulfamides limita la seva eficàcia. Actuen preferentment sobre bacteris Gram-negatius i tenen un efecte significatiu front a algunes espècies anaeròbies patògenes, com els clostridis. També mostren un lleuger efecte sobre alguns protozois, com *Plasmodium* i *Toxoplasma*.

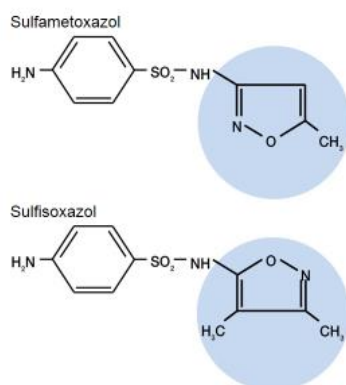


Fig. 1.16. Estructura química de dos sulfamides (derivats de la sulfanilamida) (modificat de Willey *et al.*, 2009).

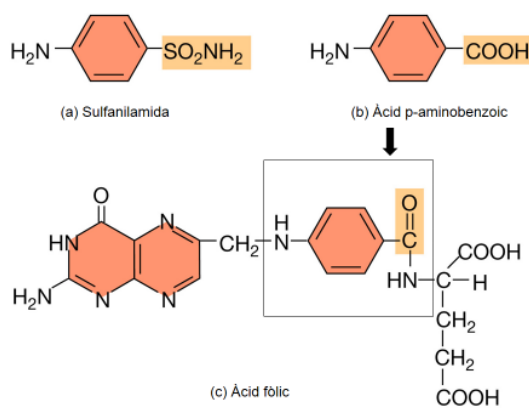


Fig. 1.17. Estructura de la sulfanilamida, de l'àcid p-aminobenzoic i de l'àcid fòlic (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

Les diaminopirimidines (trimetoprim) constitueixen la prolongació “natural” de les sulfamides, ja que actuen sobre la dihidrofolat reductasa, implicada en l'activació biològica

de l'àcid fòlic o, el que és el mateix, la formació de l'àcid folínic (tetrahidrofòlic). L'àcid tetrahidrofòlic es transforma en àcid 9,10-metilentetrahidrofòlic, que es comporta com un donador de grups metil, indispensable en la síntesi de timidina i altres reaccions anabòliques. Atenent a la complementarietat dels mecanismes bioquímics, l'associació entre sulfamides (sulfadiazina, sulfametoxazol) i diaminopirimidines (trimetoprim), mostra un efecte sinèrgic clínicament important. La potenciació de l'espectre antibacterià de les sulfamides pel trimetoprim, principal representant del grup de les diaminopirimidines, és especialment rellevant front a certes espècies anaeròbies, així com front a bacteris Gram-positius, en especial estreptococs, encara que s'han descrit resistències tant front a les diaminopirimidines com a les sulfamides (Towner *et al.*, 1980; Kärpänoja *et al.*, 2008; Joanne *et al.*, 2011; Labar *et al.*, 2012). L'aparició de resistència bacteriana a les sulfamides és molt freqüent i, al disposar de fàrmacs més eficaços, pràcticament no s'utilitzen com a teràpia única, amb l'excepció de les infeccions per *Nocardia*. Es produeix resistència creuada entre les distintes sulfamides, però no amb altres grups de fàrmacs. La resistència a les sulfamides pot desenvolupar-se fonamentalment per: (i) disminució de la permeabilitat del fàrmac; (ii) increment de la producció de PABA, i (iii) modificacions estructurals de la dihidropteroic-sintetasa, que disminueixen l'afinitat a les sulfamides (Huovinen *et al.*, 1995; Antunes *et al.*, 2005; Kärpänoja *et al.*, 2008). Un dels principals inconvenients de les sulfamides en comparació amb altres antimicrobians de més recent aparició és l'elevada freqüència d'efectes secundaris. Les reaccions més freqüents són les gastrointestinals (náusees, vòmits, diarrea) i les reaccions d'hipersensibilitat que es manifesten sobre la pell i mucoses.

1.1.3.12. Altres quimioteràpics antimicrobians

(i) Antibiòtics esteroïdics

L'únic agent d'aquest grup utilitzat actualment en clínica és l'àcid fusídic. Es va introduir en clínica en 1962. Inhibeix la síntesi proteica bacteriana, al bloquejar el procés de translocació del complex peptidil-ARNt, en els ribosomes. Presenta una acció selectiva front a bacteris Gram-positius, especialment *S. aureus*. Pràcticament sol s'utilitza sistèmicament en abscessos per estafilococs (Wang *et al.*, 2012; Bonamonte *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓ

(ii) Fosfonats

Sols la fosfomicina forma part d'aquest grup. Va ser introduïda en clínica en 1974. Presenta un espectre antibacterià relativament ampli, encara que la seva acció més marcada s'observa front a Gram-positius, tant anaerobis com aerobis. Químicament es tracta d'un fosfonat de xicotet pes molecular que actua inhibint competitiu la UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil-transferasa, al comportar-se com un antimetabolit de l'àcid fosfoenolpirúvic, molècula quasi idèntica a la fosfomicina. Aquest enzim és necessari per la síntesi de UDP-N-acetil-muràmic, constituent essencial per la biosíntesi del peptidglucà que forma la paret bacteriana. La conseqüència d'aquest bloqueig enzimàtic és la paralització de la síntesi de la paret bacteriana, això determina el seu efecte bactericida (Falagas *et al.*, 2008a; Reffert & Smith, 2014).

(iii) Mupirocina

És un derivat de l'àcid pseudomònic, present en cultius de *Pseudomonas fluorescens*. Actua unint-se a la isoleucil-ARNt-sintetasa bacteriana i impideix la incorporació d'isoleucina a les cadenes proteiques. Està disponible sol com formulació tòpica i té una activitat predominantment bactericida front a estreptococs i estafilococs, encara que també té certa activitat front a alguns Gram-negatius, com *H. influenzae*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. multocida* i, especialment, *Neisseria*. S'utilitza per la descolonització nasal de *S. aureus* resistents a meticil·lina, on el fracàs del tractament s'ha associat a resistències a la mupirocina. Les resistències, no molt freqüents encara, es deuen fonamentalment a l'alteració de la isoleucil-ARNt-sintetasa (Patel *et al.*, 2009; Poovelikunnel *et al.*, 2015).

(iv) Retapamulina

És un antibacterià d'ús exclusivament tòpic, pertany a la família de les pleuromulines (pleuromutilines), aïllat a partir de cultius del fong *Citopilus passeckerianus* (anteriorment *Pleurotus passeckerianus*). Les pleuromulines són antibiòtics àmpliament utilitzats en medicina veterinària (tiamulina). És un inhibidor de la síntesi proteica bacteriana, que actua selectivament sobre la subunitat 50S del ribosoma bacterià. Des del punt de vista químic, la retapamulina com totes les pleuromutilines, està constituïda per un nucli tricíclic complex, que determina una estructura estereoespecífica. Encara que no pot incloure's, ni química ni farmacològicament, dins del grup dels antibiòtics macròlids, les pleuromutilines tenen certa familiaritat amb ells. Té una acció marcada sobre cocs Gram-positius,

especialment sobre *S. aureus* i *S. pyogenes* (grup A), sobre els que exerceix un efecte bacteriostàtic. La retapamulina ha mostrat elevada activitat *in vitro* també sobre estafilococs coagulasa negatiu i *S. agalactiae*. Desenvolupa una acció més modesta sobre varies espècies de bacteris anaerobis, sent les menys sensibles *Bacteroides* i *Clostridium*. Amb l'excepció de *H. influenzae* i *M. catarrhalis*, la retapamulina ha mostrat molt poca activitat sobre bacteris Gram-negatius. No presenta resistència creuada amb cap altre medicament utilitzat en medicina humana, i els mecanismes generadors de resistència a retapamulina podrien estar relacionats amb mutacions en la proteïna L3 ribosomal i amb un transportador no específic (Scangarella-Oman *et al.*, 2009; Moody *et al.*, 2010).

1.2. ENTEROBACTERIS I PRODUCTES VEGETALS FRESCOS

Els enterobacteris constitueixen un grup molt ampli de microorganismes, àmpliament distribuïts en la natura, capaços de sobreviure i colonitzar diversos nínxols ecològics, com el tracte intestinal dels mamífers i les superfícies vegetals, entre altres. Un nombre reduït d'espècies són considerades com patogèniques humanes, però moltes són patògens oportunistes que causen una àmplia varietat d'infeccions en persones immunodeprimides per diferents causes. A més, el desenvolupament de resistències a antibiòtics en els enterobacteris constitueix un greu problema, especialment en les infeccions nosocomials a nivell hospitalari, problema que actualment està estenent-se a la comunitat. Els productes vegetals frescos poden contenir enterobacteris (com microbiota pròpia o per contaminació a partir del sòl, adobs d'origen animal, aigües de reg contaminades, etc.), i al ser consumits freqüentment crus (sense tractaments que inactiven als bacteris), poden actuar com vehicles d'entrada dels enterobacteris (i de les seues resistències als antibiòtics) als consumidors, on poden causar infeccions o transmetre les resistències a la seva microbiota comensal i/o patogènica. Aquestes qüestions es tracten en aquest apartat de la introducció.

1.2.1. ENTEROBACTERIS I MICROORGANISMES COLIFORMES

Els bacteris entèrics (enterobacteris, família *Enterobacteriaceae*) comprenen un grup prou heterogeni de Gamma Proteobacteris, que tenen les següents característiques fenotípiques: bacils Gram-negatius, no esporulats, immòbils o mòbils per flagels peritrics, anaerobis facultatius, oxidasa negatiu, nutricionalment poc exigents i que fermenten els sucres mitjançant dos possibles rutes metabòliques (fermentació àcid mixta i fermentació

INTRODUCCIÓ

butanodiòlica) (Denton, 2007; Willey *et al.*, 2009; Madigan *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2014).

Entre els bacteris entèrics es troben espècies patògeniques per a les plantes i els animals, inclòs l'home, així com altres espècies importants des del punt de vista industrial. Degut a la seva importància mèdica, els bacteris entèrics han sigut molt estudiats, observant-se que existeix una marcada relació genètica (determinada per homologia de seqüències d'ADN i recombinació genètica) entre moltes espècies d'enterobacteris, que es mantenen en gèneres separats per raons principalment pràctiques. La determinació de les seues característiques fenotípiques ha sigut el mètode tradicionalment utilitzat per a distingir els gèneres d'enterobacteris després del seu aïllament.

L'espècie bacteriana probablement millor coneguda és precisament l'enterobacteri *Escherichia coli*, hoste habitual de l'intestí de l'home i dels animals de sang calenta, per això aïllar-lo en l'aigua i els aliments indica un procés de contaminació d'origen fecal. Encara que la presència de quantitats relativament significatives de microorganismes no patògens en els aliments poden ser tolerables, la presència de microorganismes indicadors específics, com els coliformes, ens poden indicar la possible contaminació de la mostra analitzada per microorganismes patògens.

Els bacteris coliformes es caracteritzen per fermentar la lactosa amb producció de gas quan s'incuben a 35°C durant 48 hores. Aquesta definició de coliformes és operacional i no té caràcter taxonòmic, ja que dins dels coliformes s'inclouen una gran varietat de bacteris com són els gèneres *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Citrobacter*. Per tant, el terme coliforme engloba a microorganismes intestinals comuns com *E. coli*, patògens menys freqüents com *Klebsiella pneumoniae*, i també espècies no associades a l'intestí, com *Enterobacter aerogenes*, que es classifica dins d'aquest grup per les seues característiques fermentadores (Madigan *et al.*, 2009; Willey *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2014).

1.2.2. ENTEROPATÒGENS EN PRODUCTES VEGETALS FRESCOS: IMPLICACIONS EN SEGURETAT ALIMENTÀRIA

Actualment, la majoria de les infeccions gastrointestinals que es produeixen en els països desenvolupats no són degudes a la transmissió per l'aigua, sino pels aliments. A més, està acceptat per la comunitat científica que el consum de fruites i vegetals frescos és un factor de risc per la infecció per patògens entèrics, sent nombrosos els brots que s'han descrit ocasionats pel consum d'aquests aliments (enciam, espinac, tomata, etc.) contaminats per diferents bacteris enteropatògens (*E. coli* O157: H7, *Salmonella enterica*,

Campylobacter jejuni, etc.) (Tauxe, 1997; Burnett & Beuchat, 2001; Soriano *et al.*, 2001; Everis 2004; Sivapalasingam *et al.*, 2004; Matthews & Doyle, 2006; DuPont, 2007; Heaton & Jones, 2008; Lynch *et al.*, 2009; Kluytmans *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2014).

El consum de productes frescos ha augmentat en els últims anys degut a que es consideren components ideals per l'elaboració d'una dieta saludable. Per diversos motius existeix una forta demanda de diferents fruites i verdures fresques o mínimament processades, que es presenten empaquetades i llestes per a consumir (quarta gamma), i a ser possible que estiguin disponibles durant tot l'any, inclús fora de la seva estació de producció (Pollack, 2001; Everis, 2004). Però, els estàndards d'higiene d'aquests aliments, especialment durant el cultiu (qualitat de l'aigua de reg, adobs, etc.), la recol·lecció, i l'emmagatzematge pot variar molt segons el país, provocant l'existència d'una contaminació potencial d'aquests productes, i per tant un augment en el risc dels consumidors (Zhao *et al.*, 1997; Kaneko *et al.*, 1999; Takkinen *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006, Andargie *et al.*, 2008; Schwaiger *et al.*, 2011a; Rahube *et al.*, 2014; Zurfluh *et al.*, 2015). L'augment dels brots relacionats amb productes frescos es deu en part al canvi en els hàbits actuals. Un percentatge elevat de consumidors compra aquests productes frescos en grans supermercats, mentre que una minoria ho fa en tendes locals especialitzades. Si els productes contaminats entren en la cadena de distribució de les grans superfícies, és probable que arriben a un major nombre de consumidors i per tant els brots siguin més fàcilment identificables que els casos esporàdics, on el nombre de casos associats al consum de productes vegetals frescos es realment desconegut. La millora dels programes de vigilància han derivat en una detecció més eficaç dels brots, permetent la identificació dels productes vegetals frescos com vehicle de transmissió, i per tant, la seva inclusió en el protocol de qualsevol investigació epidemiològica. Les rutes de contaminació d'aquests aliments poden ser:

- a) Els fertilitzants orgànics. L'ús d'alguns fertilitzants orgànics (com el fem procedent de la ramaderia) pot introduir patògens directament al camp i a l'aigua de reg. Per això s'han fet estudis institucionals amb la fi d'aconsellar a l'agricultor quines són les pautes correctes pel tractament dels seus camps amb fertilitzants orgànics per evitar la seva contaminació (Natvig *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c; Nicholson *et al.*, 2005; Venglovsky *et al.*, 2009; Martí *et al.*, 2013).
- b) La qualitat de l'aigua de reg. Alguns estudis científics demostren que les aigües superficials poden contaminar-se a partir d'aigües residuals, i per tant augmentar el risc de contaminació dels productes vegetals. La qualitat microbiològica d'aquestes aigües

INTRODUCCIÓ

s'estableix rutinàriament a partir del nombre de coliformes fecals, encara que no hi ha acord sobre el nombre màxim permès en l'aigua de reg. Per exemple, l'OMS indica que per un reg sense restriccions, l'aigua no deu tindre més de 100 coliformes fecals en 100 mL, encara que aquestes quantitats varien segon el país i el tipus de cultiu, sent en general més restrictiu en l'aigua destinada al reg de cultius que es consumeixen crus (Bouwer & Idelovitch, 1987; Seymour & Appleton, 2001; Solomon *et al.*, 2002, 2003; Takkinen *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2006; Tyrell *et al.*, 2006; Rahube *et al.*, 2014)

c) El sòl. Els bacteris patògens poden estar de manera natural en el sòl o poden incorporar-se a la matriu a través de residus o fertilitzants orgànics. La capacitat del patogen per a poder sobreviure a les condicions del sòl (quantitat d'oxigen, temperatura, acidesa, etc.) influirà en la probabilitat de contaminar el cultiu, i per tant de poder arribar al consumidor (Kudva *et al.*, 1998; Santamaría & Toranzos, 2003; Stanley & Jones, 2003; Hutchison *et al.*, 2004; Nicholson *et al.*, 2005; Walsh & Duffy, 2013).

d) La supervivència del microorganisme en la filosfera de la planta. Si un bacteri enteropàtogen es capaç de sobreviure en la filosfera de la planta, augmenta la probabilitat d'infecció en el consumidor al ingerir el producte fresc (Brandl, 2006; Heaton & Jones, 2008; Tyler & Triplett, 2008).

1.2.3. ADAPTACIÓ DELS BACTERIS ENTEROPATÒGENS AL MEDI VEGETAL

L'aparició de brots relacionats amb fruites i vegetals frescos ha fet que augmenti l'interès de la xarxa de Salut Pública en aquests productes amb la fi de salvaguardar la salut del consumidor. L'adquisició de coneixements sobre la conducta dels bacteris entèrics en la planta, així com de les possibles relacions d'aquests bacteris amb altres microorganismes associats a les plantes, poden conduir al control de les malalties infeccioses relacionades amb aquests productes alimentaris (Brandl, 2006; Matthews & Doyle, 2006; Heaton & Jones, 2008; Tyler & Triplett, 2008).

En la superfície dels vegetals, especialment en les fulles i les arrels, existeixen microambients en els que hi ha un aport de nutrients i unes condicions físico-químiques (humitat, protecció front a la radiació ultraviolada, etc.) que permeten la proliferació dels microorganismes (Brandl, 2006; Heaton & Jones, 2008; Tyler & Triplett, 2008). En la superfície de les fulles existeixen agregats de microorganismes, anomenats biofilms, que estan formats per un gran conjunt d'espècies bacterianes, fongs filamentosos i llevats, que

poden atenuar els canvis ambientals, la falta de nutrients i la dessecació. S'ha demostrat que entre el 30% i el 80% de la població total bacteriana que existeix en la superfície de la fulla es troba continguda en aquests agregats (Morris *et al.*, 1998; Morris & Monier, 2003; Monier & Lindow, 2005). Els bacteris enteropatògens poden desenvolupar mecanismes (expressió de gens, mobilitat i/o producció de components extracel·lulars) per a poder incloure's en aquests agregats i d'aquesta manera competir amb els bacteris que allí existeixen, sobrevivint així de manera més efectiva en aquest ambient i als tractaments antimicrobians (Beuchat, 1999; Fett, 2000; Guo *et al.*, 2001, 2002; Jacobs & Sundin, 2001; Brandl & Mandrell, 2002; Dong *et al.*, 2003; Barak *et al.*, 2004; Stopforth *et al.*, 2004; Iñiguez *et al.*, 2005; Richards & Beuchat, 2005; Brandl, 2006; Cooley *et al.*, 2006; Mandrell *et al.*, 2006; Solomon & Matthews, 2006; Solomon *et al.*, 2006; Linderberg, 2012; Vakulskas *et al.*, 2015).

L'adhesió és la primera etapa per establir-se el patògen en la superfície de la planta, i poden estar implicats en aquest procés diversos mecanismes. En general, es pensa que els bacteris posseeixen estratègies similars a les utilitzades per altres patògens per adherir-se als epitelis animals i humans, com pot ser el desenvolupament de fimbries, que participen en la unió i la invasió de cèl·lules epitelials animals (Sukupolvi *et al.*, 1997; Uhlich *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2005; Mandrell *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2011; Vakulskas *et al.*, 2015). Per tant, les espècies enteropatogèniques tenen mecanismes d'adhesió solapats per interaccionar tant amb teixits animals com vegetals, que són compartits en part amb els patògens estrictament vegetals (Brandl, 2006; Heaton & Jones, 2008).

S'han fet estudis per comparar les dinàmiques poblacionals dels bacteris associats a les fulles (bacteris epifítics) amb les espècies bacterianes que colonitzen l'intestí humà, per obtenir una millor comprensió dels caràcters d'adaptació bacteriana requerits per la colonització de la fillosfera. Aquests estudis demostraren que *S. enterica* i *E. coli* poden assolir grandàries de població similars als de *Pseudomonas syringae* en la fillosfera del fesol i del panís, en condicions d'humitat constant, mentre que la seva població va ser significativament més baixa que la dels bacteris epifítics quan s'incubaren en condicions de sequedat. Tanmateix, la incubació a temperatures elevades (30-37°C) facilita la proliferació dels bacteris entèrics. Per tant, és probable que l'aigua de la pluja, la rosada o el reg, junt a una elevada temperatura, capaciten als bacteris entèrics per a multiplicar-se en les plantes, de manera que poden assolir la població necessària per a poder causar brots després del seu consum. A pesar d'això, els bacteris entèrics no estan tan ben adaptats com

INTRODUCCIÓ

els bacteris que colonitzen plantes epifítiques per poder utilitzar els nutrients presents en la superfície de la planta, i per tant, tenen limitat el seu creixement. Per exemple, a diferència dels bacteris associats a les plantes, *E. coli* i *S. enterica* no poden assimilar la sacarosa, un dels principals sucres presents en la fulla i en els exudats de les arrels (Iuchi & Lin, 1991; Lindow & Brandl, 2003; Brandl, 2006). És per això que s'ha proposat com a tècnica de control biològic l'ús de bacteris epifítics per a prevenir el creixement de patògens en vegetals (Cooley *et al.*, 2006; Enya *et al.*, 2007).

Per altra part, la persistència dels bacteris patògens en aliments frescos és de gran interès en Salut Pública per poder avaluar els riscos associats a la contaminació, ja que s'ha demostrat que els bacteris entèrics poden sobreviure durant períodes prolongats de temps (Gagliardi & Karns, 2002; Natvig *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2003; Brandl, 2006). Així per exemple, estudis realitzats amb *S. enterica* i *E. coli* revelen que aquests bacteris són capaços de persistir en la fillosfera de l'enciam durant un període de temps de 3 a 6 mesos, o que *S. enterica* sobreviu en ravens i carlotes entre 84 i 203 dies (Islam *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c).

Recentment s'ha demostrat que bacteris entèrics, incloent patògens humans com *Salmonella* i *E. coli* O157:H7, són habitants comuns de l'interior de les plantes (bacteris endofítics), on poden arribar a través dels sistemes radicals de les arrels o bé a través de les ferides, les lenticel·les o els estomes. En aquests bacteris s'han descrit factors de virulència comuns als patògens animals i vegetals (Heaton & Jones, 2008; Tyler & Triplett, 2008).

Els fongs són microorganismes importants que acompanyen als bacteris en la superfície de la planta. De particular interès en l'ecologia dels bacteris entèrics de les fruites i vegetals és la seva interacció amb els fongs, que pot causar alteracions post-collita en els productes frescos, i que serveix a vegades per permetre la supervivència i la penetració d'enterobacteris en productes vegetals (Conway *et al.*, 2000; Riordan *et al.*, 2000; Richards & Beuchat, 2005).

També ha sigut estudiada la relació dels bacteris amb els protozous, sobre tot en la rizosfera, on s'ha demostrat l'existència d'una interacció entre *E. coli*, *S. enterica* i *Tetrahymena*, per la qual el protozou allibera els bacteris viables dins de vesícules membranoses; aquestes vesícules els confereixen una major resistència que els bacteris que permaneixen lliures, ja que actua com factor de protecció front a l'estrès ambiental. Aquestes interaccions també podrien passar en la superfície de la planta i protegir als bacteris implicats en la contaminació dels productes frescos. Encara que fan falta estudis addicionals sobre les interaccions planta-bacteri que condueixen a la colonització pre- i

post-collita dels productes vegetals per bacteris entèrics, l'evidència indica malgrat no estar tan ben adaptats com les espècies epifítiques, posseeixen la capacitat de poder créixer i persistir en els vegetals. Aquesta versatilitat podria explicar la incidència de malalties entèriques relacionades amb la ingestió dels productes vegetals frescos (Brandl & Mandrell, 2002; Brandl *et al.*, 2005; Brandl, 2006; Matthews & Doyle, 2006; Heaton & Jones, 2008; Tyler & Triplett, 2008).

1.2.4. AGRICULTURA ECOLÒGICA

Segons la definició del MAGRAMA (“Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente”) i la Comissió Europea, es parla d'agricultura ecològica quan l'agricultor realitza una sèrie de tècniques agràries en les que no utilitza, ni en agricultura ni en ramaderia, productes químics de síntesi, com adobs, plaguicides antibiòtics, etc., amb l'objectiu de respectar el medi ambient, mantenir o augmentar la fertilitat del sòl i proporcionar al consumidor aliments amb totes les seues propietats naturals (Drinkwater, 2009; Blair, 2011; Smith-Spangler *et al.*, 2012).

Segons la Comissió del Codex Alimentarius (òrgan intergovernamental del programa conjunt FAO/OMS sobre normes alimentàries) es deuen complir els següents requisits:

- Rotació de cultius per l'ús eficient dels recursos *in situ*.
- Limitació estricta de l'ús de pesticides i fertilitzants sintètics, antibiòtics pel bestiar, additius i coadjuvants en aliments.
- No es permet l'ús d'organismes modificats genèticament (OMG) i queda totalment prohibit el tractament per radiacions ionitzants.
- Aprofitament dels recursos *in situ*, tal com el fem per la fertilització o aliments pel bestiar produïts en la pròpia granja.
- Selecció d'espècies vegetals i animals resistent a malalties i adaptades a les condicions locals.
- Criar el bestiar en zones a l'aire lliure i espais oberts i alimentació ecològica.
- Ús de pràctiques apropiades per la cria de diferents espècies de bestiar.

El Codex Alimentarius ha establert unes llistes de substàncies permeses per la producció d'aliments orgànics, d'acord amb les directrius dels governs nacionals i els reglaments nacionals pertinents, sempre i quan s'usen de forma adient sense riscos d'alterar l'ecosistema, el sòl o la granja.

Hi ha una sèrie de normes i reglaments per la importació, producció i etiquetat de productes ecològics que la Comissió Europea (CE) ha formulat per evitar que aquestes

INTRODUCCIÓ

tècniques puguin ser fraudulentas i no haja cap tipus d'engany al consumidor. L'agricultura ecològica es troba regulada legalment en Espanya pel MAGRAMA des de 1989, quan es va aprovar el Reglament de la Denominació Genèrica "Agricultura Ecològica", que es va aplicar fins l'entrada en vigor en la UE del Reglament (CEE) 2092/91 sobre la producció agrícola ecològica i la seva indicació en els productes agraris i alimentaris. Des del 1 de gener de 2009, la producció ecològica es troba regulada pel Reglament (CE) 834/2007 sobre producció i etiquetat dels productes ecològics (pel que es deroga el Reglament (CEE) 2092/91) i per altres Reglaments: R(CE) 889/2008 i R(CE) 1235/2008, pels que s'estableixen disposicions d'aplicació del R(CE) 834/2007 amb respecte a la producció ecològica, el seu etiquetat i control.

El logotip d'agricultura ecològica de la UE oferís als consumidors plenes garanties de que l'origen i la qualitat dels aliments i begudes compleix els requisits establerts en el Reglament d'agricultura ecològica de la UE. A partir de juliol de 2010, el logotip ecològic de la UE és obligatori per a tots els aliments ecològics pre-envasats en la Unió Europea. També es pot utilitzar el logotip de forma voluntària en aliments ecològics no pre-envasats produïts en la UE o per qualsevol dels productes ecològics importats d'altres països.

El Reglament de la UE sobre la producció agrària ecològica detalla com deuen gestionar-se els cultius i el bestiar, i com han de ser elaborats els pinsos i farratges que vagin a ser etiquetats com ecològics. Els productes que porten el logotip d'agricultura ecològica de la UE han de complir els requisits especificats en la normativa de la UE. L'etiquetat dels productes procedents de l'agricultura orgànica ha d'anar acompanyat necessàriament pel codi dels organismes d'inspecció encarregats d'examinar i certificar als operadors ecològics.

En Espanya, el control i la certificació de la producció agrària ecològica és competència de les Comunitats Autònomes, i es fa majoritàriament per autoritats de control públiques, a través de Consells o Comitès d'Agricultura Ecològica Territorials, que són organismes dependents de les corresponents Conselleries o Departaments d'Agricultura, o directament per Direccions Generals adscrites a les mateixes. No obstant, les Comunitats Autònomes d'Andalusia i Castella La Manxa han autoritzat organismes privats per la realització d'aquestes funcions i, en el cas d'Aragó, les autoritats competents han designat una autoritat de control pública i han autoritzat organismes de control privat. Com distintiu per a que el consumidor pugui distingir en el mercat els productes de l'agricultura ecològica, totes les unitats envasades, a més de la seva pròpia marca i alguna de les mencions específiques del producte, porten imprès el codi de l'autoritat i de

l'organisme de control o un logotip específic amb el nom i el codi de l'entitat de control. També deu anar imprès el logotip comunitari de la UE, que és obligatori des del 1 de juliol de 2010, en les condicions establertes en la normativa. Tot això significa que el lloc on s'ha produït o elaborat el producte, està sotmès als controls i inspeccions corresponents de l'Autoritat o de l'Organisme establert a l'efecte en la respectiva Comunitat Autònoma. Això constitueix l'única garantia oficial de que el producte respon a la qualitat suposada pel consumidor i compleix les normes establertes en el Reglament (CE) 834/2007 i les seues disposicions d'aplicació.

1.2.5. RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS EN LA COMUNITAT

Els antibiòtics són usats en medicina humana i veterinària com ferramentes terapèutiques per a tractar o prevenir malalties infeccioses, així com per altres fins, com són la promoció del creixement d'animals destinats al consum humà en la indústria ramadera. L'aparició de resistències bacterianes als antibiòtics és un fenomen tan antic com els propis antibiòtics, i protegeix als microorganismes dels seus propis productes antibacterians o de l'atac dels produïts per altres microorganismes en una competició per la supervivència. Alguns antibiòtics poden induir l'aparició de resistències en els microorganismes mitjançant distints mecanismes (mutacions espontànies, recombinació genètica), de manera que les soques resistents, tan les patògenes com les comensals, poden expandir-se i arribar a ser dominants en l'home i animals, gràcies a la pressió selectiva que suposa l'ús dels propis antibiòtics (De la Cruz & Davies, 2000; Drlica & Zhao, 2007; Aminov, 2011; Fisher *et al.*, 2013; Baquero *et al.*, 2013). L'ús massiu i de vegades indiscriminat d'antibiòtics durant les últimes dècades ha generat l'aparició d'un nombre creixent de soques resistents als distints antibiòtics, proporcional a l'ús de cada antimicrobià, i que constitueix actualment un greu problema clínic a l'àmbit hospitalari, que també està estenent-se a l'àmbit comunitari (Fig. 1.18 i Fig 1.19) (Ball *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2006a; Lázaro & Oteo, 2006; Tenover, 2006; Denton, 2007; MacGowan, 2008; Bush, 2012; Manges & Johnson, 2012; Karaiskos & Giamarellou, 2014; Vasoo *et al.*, 2015). L'ús d'antibiòtics en ramaderia afavoreix la selecció de bacteris resistents, que per varies vies (aplicació de fem als camps de cultiu, contaminació d'aigües de reg) poden arribar als vegetals (tal com s'ha comentat anteriorment en aquesta Introducció), i més, l'ús d'antibiòtics i de plaguicides en agricultura pot induir la selecció de mecanismes de resistència en els bacteris presents en les plantes i en el sòl (Lipsitch *et al.*, 2002; McManus

INTRODUCCIÓ

et al., 2002; Gamón *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2004; Geser *et al.*, 2012; Walsh, 2013; García-Migura *et al.*, 2014).

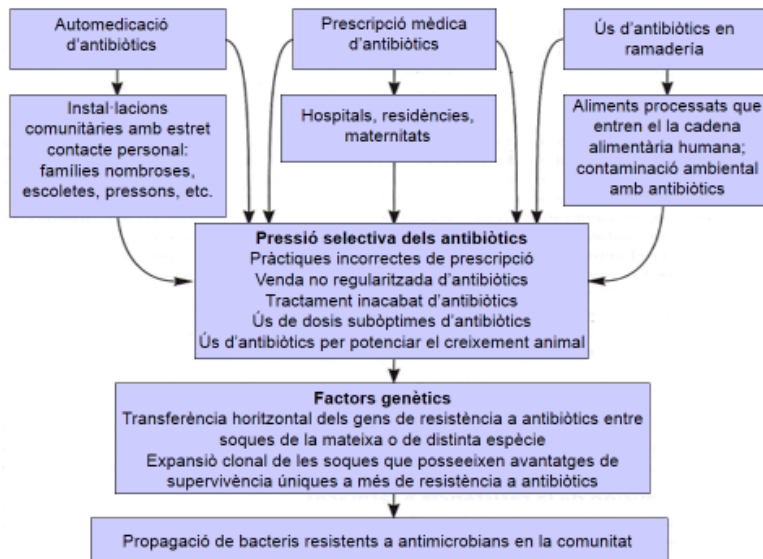


Fig. 1.18. Orígens de la resistència als antibiòtics. L'ús incorrecte i indiscriminat dels antibiòtics en els éssers humans i en els animals condueix a un augment de la pressió selectiva sobre els bacteris. Els bacteris capaços de resistir als antibiòtics sobreviuen i propaguen aquestes característiques mitjançant transferència genètica horitzontal (modificat de Willey *et al.*, 2009).

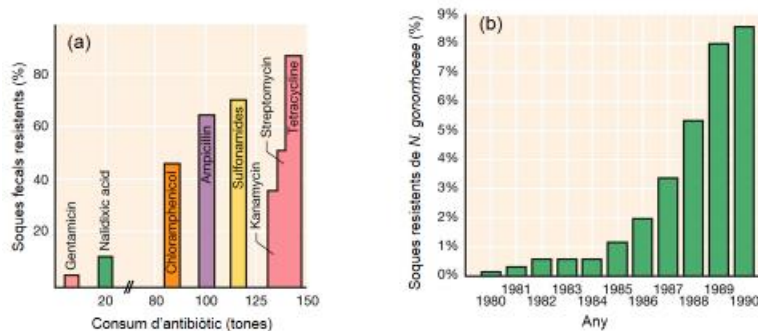


Fig. 1.19. La freqüència d'aparició de resistències als diferents antibiòtics és proporcional al seu consum (a), i per tant va augmentant amb el temps d'ús dels antibiòtics, com és el cas de les soques de *Neisseria gonorrhoeae* resistents a la penicil·lina (modificat de Madigan *et al.*, 2009).

La presència de bacteris resistents a antibiòtics en els productes vegetals frescos, representa un risc addicional pel consumidor, especialment pel fet de que freqüentment aquests productes són ingerits directament sense cap tractament antimicrobià efectiu (Schwaiger *et al.*, 2011b). Per tant, aquestes soques resistents poden aplegar en forma viable a l'intestí humà, on poden sobreviure almenys de manera transitòria (cal recordar que moltes de les espècies d'enterobacteris estan teòricament capacitades per adaptar-se a l'ecosistema del colon humà). La microbiota de l'intestí humà és un ecosistema extremadament complex on poden tenir lloc processos de transferència horitzontal de gens entre soques de la mateixa o de distintes espècies; d'aquesta manera les resistències a antibiòtics poden transferir-se a la microbiota comensal i/o patogènica del consumidor, contribuint a la disseminació de les resistències en la comunitat (Heder & Samalla, 2007; Kurokawa *et al.*, 2007; Aminov, 2011; Baquero, 2012; Baquero *et al.*, 2013). La participació dels vegetals frescos com vehicles de transmissió de resistències a antibiòtics es descriu en el següent apartat (1.2.6) d'aquesta Introducció.

Els mecanismes de resistència bacteriana als antibiòtics, així com els processos de transferència horitzontal de gens que contribueixen a la disseminació de les resistències entre els bacteris ja s'han descrit detalladament en la primera part d'aquesta Introducció, i en aquest apartat es presenta un breu resum (Tenover, 2001, 2006; Cantón *et al.*, 2006b; Cantón *et al.*, 2011; Giedraitiene *et al.*, 2011).

S'entén com resistència als antibiòtics a la capacitat d'un microorganisme per a resistir els efectes d'un agent quimioteràpic al que es sensible habitualment. Existeixen varies raons per les que un microorganisme pot ser resistent a certs antibiòtics :

- El microorganisme no té l'estructura diana de l'antibiòtic.
- El microorganisme és impermeable a l'antibiòtic.
- El microorganisme té la capacitat d'alterar l'antibiòtic, inactivant-lo.
- El microorganisme modifica la diana de l'antibiòtic.
- El microorganisme altera la ruta metabòlica inhibida per l'antibiòtic.
- El microorganisme és capaç d'expulsar l'antibiòtic que ha penetrat en la cèl·lula.

Els mecanismes de resistència bacteriana són fonamentalment tres (Daza Perez, 1998; Cantón *et al.*, 2006b; Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Cantón *et al.*, 2011; Giedraitiene *et al.*, 2011):

- (i) Inactivació de l'antibiòtic per enzims produïts pel bacteri: per exemple, les beta-lactamases produïdes per molts bacteris hidrolitzen l'anell beta-lactàmic i inactiven

INTRODUCCIÓ

l'acció dels antibiòtics beta-lactàmics; els enzims modificadors d'aminoglucòsids, que al modificar l'estructura d'aquests antibiòtics donen lloc a una molècula incapaç d'exercir la seva acció. Els enzims modificadors poden tenir codificació cromosòmica o plasmídica, i sintetitzar-se constitutiva o induïblement (Bush & Jacoby, 2010).

- (ii) Modificacions bacterianes que bloquegen l'arribada de l'antibiòtic al bacteri: són mecanismes que confereixen poca capacitat de resistència, però associats a altres contribueixen a augmentar-la. Poden ser de dos tipus:

(a) *Disminució de la permeabilitat de la membrana*: en els bacteris Gram-negatius, l'arribada del fàrmac a l'interior té lloc per mitjà de porines. Mutacions en l'estructura d'aquestes porines o la disminució del nombre total, dificulta la penetració de l'antibiòtic hidròfil dins del bacteri. També, modificacions en el polisacàrid de la membrana externa dels bacteris Gram-negatius pot impedir l'accés d'alguns antibiòtics.

(b) *Mecanismes d'expulsió activa*: provoquen l'eixida del fàrmac, el qual no podrà acumular-se en quantitat suficient com per a que actuï eficaçment. Es coneixen bombes específiques d'un tipus de fàrmac i d'altres, que són capaces d'eliminar diferents compostos, les anomenades bombes multidroga.

- (iii) Alteració per part del bacteri del seu lloc diana, impedit o dificultant l'acció de l'antibiòtic: per exemple, alteracions a nivell de l'ADN girasa i de la topoisomerasa IV que confereixen resistència a quinolones, o mutacions a nivell del gens que codifiquen les PBPs i que donen lloc a PBPs alterades amb molt baixa afinitat pels antibiòtics beta-lactàmics.

La resistència a antibiòtics pot ser codificada genèticament en el cromosoma o en plasmidis de resistència o factors R. Aquests plasmidis contenen gens que codifiquen enzims que modifiquen i inactiven el fàrmac o que el bombegen fora de la cèl·lula (Madigan *et al.*, 2009; Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Baquero, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2012; Baquero *et al.*, 2013). Els mecanismes de transferència gènica implicats en la disseminació de resistències entre bacteris s'han descrit anteriorment (apartat 1.1.2 de la Introducció).

1.2.6. ELS VEGETALS FRESCOS COM VEHICLES DE TRANSMISSIÓ DE RESISTÈNCIES

La zona de regadiu de València és molt coneguda pels productes agrícoles frescos, encara que algunes pràctiques, tal com l'ús de fem com adob agrícola, poden contribuir a la contaminació bacteriana de les verdures amb soques resistents als antibiòtics. A més, en hospitals espanyols, inclosa la Comunitat Valenciana, ha hagut en els últims anys un augment significatiu en el percentatge de soques productores de BLEEs (beta-lactamases d'espectre estès) entre els enterobacteris, tals com *E. coli*, *K. pneumoniae* i espècies d'*Enterobacter* (Diestra *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2009, 2010; Seral *et al.*, 2010), i l'aparició de soques multiresistents als beta-lactàmics i altres antibiòtics representa un greu problema clínic, que com s'ha dit abans, està estenent-se també a l'àmbit comunitari (en l'apartat següent, 1.2.7, d'aquesta Introducció es descriu més àmpliament aquesta qüestió). A més, les penicil·lines i les cefalosporines de tercera generació han sigut considerades com antimicrobians d'importància crítica segons l'OMS (Collignon *et al.*, 2009), pel que la disseminació de resistències front a aquests antibiòtics representa un problema important. Com s'ha indicat en la Fig. 1.18, les resistències poden arribar a la comunitat de múltiples maneres. Els aliments vegetals frescos també poden estar implicats en la transmissió de resistències bacterianes en espècies enteropatógeniques (Boehme *et al.*, 2004; DuPont, 2007). Varis factors expliquen aquest fenomen: (i) l'ús a escala industrial d'antibiòtics en ramaderia per a millorar la producció animal és molt important quantitativament; al voltant de la meitat dels antibiòtics que es produeixen en Estats Units s'usen amb aquesta finalitat (Lipstich *et al.*, 2002; Colignon & Angulo, 2006; Sarmah *et al.*, 2006; Geser *et al.*, 2012; Fisher *et al.*, 2013; García-Migura *et al.*, 2014), i en Espanya fins el 40% del consum total d'antibiòtics és veterinari, el que facilita la seva incorporació (i la de bacteris resistents) a la cadena alimentària (Quirce & Freire, 2011), i (ii) l'ús de fem com adob agrícola, o el d'aigües contaminades amb matèria d'origen fecal com reg en plantacions agrícoles. Quan s'utilitza fem com adob, poden ser alliberats al medi ambient quantitats residuals d'antibiòtics i/o bacteris portadors de resistències (Sarmah *et al.*, 2006; Chee-Sanford *et al.*, 2009). De fet, diferents estudis han descrit una elevada prevalença de resistències a antibiòtics en diferents tipus de fem utilitzats en agricultura, i consegüentment en el sòl, productes vegetals i aigües superficials (Heuer *et al.*, 2006; Sarmah *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2009; Venglovsky *et al.*, 2009; Martí *et al.*, 2013; Blaak *et al.*, 2014). D'aquesta manera, les plantes poden contaminar-se amb bacteris enteropàtogens, o comensals intestinals, portadors de resistències, que són capaços de sobreviure i/o multiplicar-se en

INTRODUCCIÓ

els vegetals, i per tant arribar al consumidor (Schwaiger *et al.*, 2011b; Zurfluh *et al.*, 2015). Com exemple, hi ha que citar que durant un brot comunitari per *E. coli* O157, es va detectar una àmplia distribució de soques d'*E. coli* multiresistents com contaminants de productes vegetals comercialitzats (Phillips *et al.*, 1988; Riley *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 2004). Altre factor que contribueix a l'aparició de bacteris resistents en vegetals és l'ús d'alguns antibiòtics per la prevenció de malalties bacterianes en plantes (McManus *et al.*, 2002; Vidaver, 2002; Phillips *et al.*, 2004). Encara que no hi ha estudis epidemiològics rigorosos, no es pot descartar la contribució d'aquests factors en l'aparició de resistències en bacteris enteropatògens humans; donat que existeix una especificitat entre soques d'enterobacteris i les seues preferències per diferents hostes animals, la majoria de resistències en soques humanes tenen un origen humà, i per tant, el vertader perill de la utilització d'antibiòtics en la producció ramadera és discutible i està baix estudi, devent comparar-se els beneficis i els perjudicis del mateix (Mathew *et al.*, 2007; Moyaert *et al.*, 2014). Alguns autors han suggerit que l'ús d'antibiòtics nous en producció ramadera hauria de retardar-se fins que haja acabat el període de la seva utilitat màxima en medicina humana (Lipsitch *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2004).

En qualsevol cas, la comercialització de productes vegetals frescos contaminats amb soques resistents representa un problema significatiu de salut pública, ja que pot originar infeccions de difícil tractament en el cas de que es tracte de bacteris enteropatògens, o bé contribuir a estendre la resistència a altres bacteris intestinals si es tracta de microorganismes comensals (Aarestrup *et al.*, 2008; Walsh & Fanning, 2008), tenint en compte que els bacteris que contenen determinants de resistència poden tenir una gran influència en la transferència dels gens de resistència en hàbitats naturals, com l'intestí humà que es considerat com un "hot spot" per la transferència horitzontal de gens entre bacteris (De la Cruz & Davies, 2000; Heuer & Samalla, 2007; Kurokawa *et al.*, 2007; Aminov, 2011; Baquero, 2012; Baquero *et al.*, 2013). Per últim, la manipulació d'aquests aliments en la cuina del propi consumidor pot representar una font de contaminació encreuada per a altres aliments.

1.2.7. INFECCIÓ NOSOCOMIAL I RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS

La resistència a molts fàrmacs dins de la família *Enterobacteriaceae* i altres grups de bacteris està convertint-se en un problema creixent d'infeccions nosocomials (infeccions adquirides durant l'estada en un hospital i que no estaven presents, ni en el període d'incubació, en el moment de l'ingrés del pacient) (Alonso & Baquero, 1994; Cantón *et al.*, 72

2002; Colodner, 2005; Paterson, 2006; Hidron *et al.*, 2008; Logan, 2012; Karaiskos & Giamarellou, 2014). Actualment el concepte d'infecció nosocomial està canviant degut a que l'assistència sanitària també ho fa. La població de risc ha augmentat considerablement en les últimes dècades com a conseqüència dels avanços mèdics, ja que s'apliquen tècniques diagnòstiques i terapèutiques cada vegada més agressives i en distints escenaris clínics, havent-se incrementat la seva freqüència fora de l'hospital. Açò ha conduït a un concepte més ampli de la infecció nosocomial, generant-se el concepte d'IRAS (infeccions relacionades amb l'assistència sanitària), que inclou tres grups: infecció nosocomial clàssica, la comunitària i la del personal sanitari. En Espanya, el nombre d'IRAS s'estima en uns 350.000 malalts/any, i la mortalitat global atribuïble a la infecció oscil·la entre 2-15% (Santos & Gobernado, 2011a, 2011b).

La resistència als antibiòtics en els bacteris Gram-negatius clínicament rellevants (incloses les espècies d'enterobacteris) és un problema cada vegada més important, que en els últims anys s'ha estès des de l'hospital a la comunitat (Hernández *et al.*, 2003, 2005; Ho *et al.*, 2010; Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Tzouveleki *et al.*, 2012; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Fernández-Cuenca *et al.*, 2013; Rodríguez-Baño *et al.*, 2015; Vasoo *et al.*, 2015). La resistència als beta-lactàmics en enterobacteris, i altres bacils Gram-negatius (Taules 1.2, 1.3 i 1.4), és un problema clínic creixent que està sent molt estudiat i que pot servir de paradigma per l'estudi de les resistències a altres antibiòtics (Cantón *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2013; Nordmann, 2014).

La resistència als antibiòtics pot evolucionar en soques clíniques que abans eren sensibles mitjançant la transferència de plasmidis coneguts com factors R (de resistència) o plasmidis R. Els bacteris entèrics Gram-negatius tenen freqüentment un plasmidi R que codifica la resistència a varis antibiòtics. Un percentatge creixent de soques dels gèneres *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* i *Providencia*, a més d'algunes soques indol positiu de *Proteus* i soques resistents a la cefalotina d'*Escherichia coli*, tenen beta-lactamases (enzims que trenquen els enllaços beta-lactama d'alguns antibiòtics) que confereixen per tant, resistència encreuada a molts antibiòtics beta-lactàmics (Diestra *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Seral *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2012).

La resistència a molts fàrmacs dins de la família *Enterobacteriaceae* està convertint-se en un problema creixent en infeccions nosocomials (Paterson, 2006; Hidron *et al.*, 2008; Logan, 2012; Cantón *et al.*, 2012). Els antibiòtics beta-lactàmics han servit eficaçment com agents antimicrobians des de la segona guerra mundial, però encara estan desenvolupant-se noves molècules per a contrarestar els mecanismes bacterians de resistència als beta-

INTRODUCCIÓ

lactàmics (Page & Heim, 2009; Bush, 2012). La hidròlisi d'antibiòtics beta-lactàmics per acció de BLEEs (que confereixen resistència a penicil·lines, cefalosporines i monobactames), han assolit nivells alarmants i actualment es coneixen més de 1.000 seqüències de proteïnes úniques de BLEEs, de localització tant cromosòmica com plasmídica (Jacoby, 2009; Bush & Jacoby, 2010; Lynch *et al.*, 2013).

Taula 1.2. Resistència dels bacteris Gram-negatius front a les penicil·lines (modificat de Cuéllar, 2011).

Microorganisme	Bencilpenicil·lina G	Cloxacil·lina	Amoxicil·lina	Amoxicil·lina/ Clavulànic	Piperacil·lina/ Tazobactam
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	-	-	-	++
<i>Aeromonas</i> spp.	-	-	-	++	++
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	-	nd
<i>Citrobacter</i> spp.	-	-	-	-	++
<i>Enterobacter</i> spp.	-	-	-	-	++
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	++	++
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	+	++	++
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	-	++	++
<i>Legionella</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	++	++
<i>Morganella</i> spp.	-	-	-	+	++
<i>Pasteurella multocida</i>	++	-	++	++	++
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	++
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	+	++	++
<i>Serratia</i> spp.	-	-	-	-	++
<i>Shigella</i> spp.	-	-	+	++	++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	+	++

(-) : activitat nul·la o molt limitada (<30% de soques susceptibles)

(+) : activitat moderada (30-60% de soques susceptibles)

(++) : activitat elevada (>60% de soques susceptibles)

(nd): dades no disponibles

Taula 1.3. Resistència de bacteris Gram-negatius front a les cefalosporines (modificat de Cuéllar, 2011).

Microorganisme	Cefalexina	Cefaclor	Cefuroxima	Cefotaxima	Ceftazidima
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	-	-	++	++
<i>Aeromonas</i> spp.			++	++	++
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	+	++
<i>Citrobacter</i> spp.	-	+	+	++	++
<i>Enterobacter</i> spp.	-	-	+	++	++
<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	++	++
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	++	++	++	++
<i>Klebsiella</i> spp.	++	++	++	++	++
<i>Legionella</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	+	++	++	++
<i>Morganella</i> spp.	-	-	+	++	++
<i>Pasteruella multocida</i>	-	nd	nd	nd	nd
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	++	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	++
<i>Salmonella</i> spp.	-	nd	nd	++	nd
<i>Serratia</i> spp.	-	-	-	++	++
<i>Shigella</i> spp.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	nd	nd	+	++	+

(-): activitat nul·la o molt limitada (<30% de soques susceptibles)

(+): activitat moderada (30-60% de soques susceptibles)

(++): activitat elevada (>60% de soques susceptibles)

(nd): dades no disponibles

Els focus de contagi de les infeccions nosocomials poden ser: la pròpia microbiota del pacient, patògens presents en altres pacients o en el personal sanitari, i els presents en l'ambient hospitalari, que majoritàriament provenen dels propis pacients colonitzats o infectats (Weinstein, 1991; Sahuquillo *et al.*, 2011b; López-Cerero, 2013; López-Cerero *et al.*, 2013).

Les infeccions nosocomials que tenen lloc amb major freqüència són: urinàries, de localització quirúrgica, del tracte respiratori (pneumònies) i les bacterièmies; entre la resta d'infeccions cal destacar les diarrees nosocomials (Fig. 1.20). En general, com s'ha dit abans, es tracta d'infeccions relacionades amb procediments assistencials invasius: catèters, cirurgia i ventilació mecànica assistida i sobretot en persones amb immunosupressió

INTRODUCCIÓ

(Polage *et al.*, 2012; Zarb *et al.*, 2012; López-Cerero, 2013; Pigrau, 2013; Pujol & Limón, 2013).

Taula 1.4. Resistència de bacteris Gram-negatius front a monobactames i carbapenems (modificat de Cuéllar, 2011).

Microorganisme	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Aztreonam
<i>Acinetobacter</i> spp.	+	++	++	-
<i>Aeromonas</i> spp.	++	++	++	++
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	++	-
<i>Citrobacter</i> spp.	++	++	++	++
<i>Enterobacter</i> spp.	++	++	++	++
<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	++
<i>Haemophilus influenzae</i>	++	++	++	+
<i>Klebsiella</i> spp.	++	++	++	++
<i>Legionella</i> spp.	-	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	++	++	++	+
<i>Morganella</i> spp.	++	++	++	++
<i>Pasteurella multocida</i>	++	++	nd	++
<i>Proteus vulgaris</i>	++	++	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	++	++	++
<i>Salmonella</i> spp.	++	++	++	++
<i>Serratia</i> spp.	++	++	++	++
<i>Shigella</i> spp.	++	++	++	++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	nd	++	nd	++

(-): activitat nul·la o molt limitada (<30% de soques susceptibles)

(+): activitat moderada (30-60% de soques susceptibles)

(++): activitat elevada (>60% de soques susceptibles)

(nd): dades no disponibles

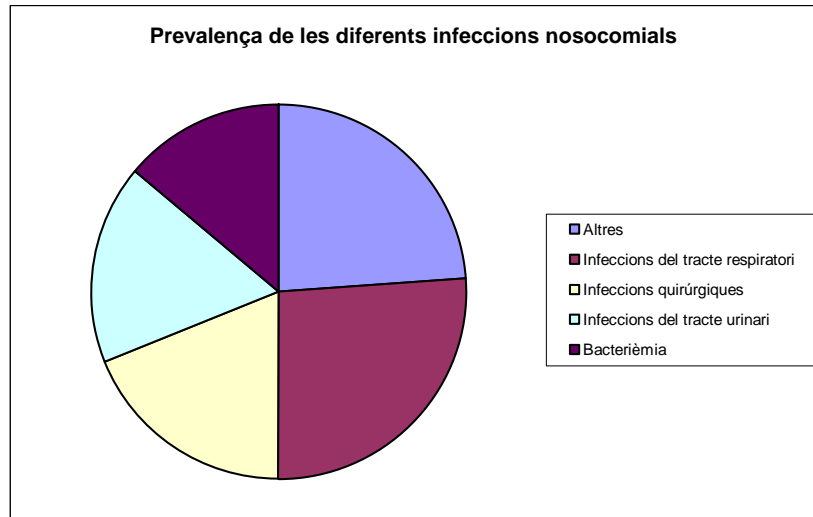


Fig. 1.20. Prevalença de les diferents infeccions nosocomials (modificat de Zarb *et al.*, 2012; Pujol & Limón, 2013).

Taula 1.5. Distribució de microorganismes responsables de la infecció nosocomial en hospitals d'Estats Units durant el període 2009-2010 (modificat de Sievert *et al.*, 2013).

Espècie microbiana	Nombre d'infeccions (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12635 (15,57 %)
<i>Escherichia coli</i>	9351 (11,52 %)
ECN d'estafilococ	9261 (11,41)
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	6470 (7,97 %)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6111 (7,53 %)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5484 (6,75 %)
<i>Candida albicans</i>	4275 (5,26 %)
<i>Enterobacter</i> spp.	3821 (4,70 %)
Altres espècies de <i>Candida</i>	3408 (4,20 %)
<i>Enterococcus faecium</i>	3314 (4,08 %)
<i>Enterococcus</i> spp.	2409 (2,96 %)
<i>Proteus</i> spp.	2031 (2,50 %)
<i>Serratia</i> spp.	1737 (2,14 %)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1490 (1,83 %)
Altres	9304 (11,46 %)
TOTAL	81139 (100%)

INTRODUCCIÓ

Segons les dades de l'estudi EPINE (Estudi de Prevalença de les Infeccions Nosocomials en Espanya) els microorganismes productors de la major part de les infeccions nosocomials són: *Escherichia coli* en primer lloc, seguit de *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. El “National Healthcare Safety Network” (NHSN), programa de referència de vigilància de les infeccions nosocomials en Estats Units, fa referència a la freqüència relativa dels diferents microorganismes en funció del focus. Des d'aquest punt de vista i considerant els focus més habituals, destaca *S. aureus* com el major productor de la pneumònia associada a ventilació mecànica i a infeccions quirúrgiques, *E. coli* causant de les infeccions urinàries i els estafilococs del grup coagulasa negatiu com els majors causants de les bacterièmies (Pujol & Limón, 2013; Sievert *et al.*, 2013) (Taula 1.5). Aquests resultats són semblants, encara que no idèntics, a l'informe corresponen a l'any 2009 del projecte EARSS (“European Antimicrobial Resistance Surveillance System”), on es va recollir informació d'un total de 8.509 aïllats procedents de 33 laboratoris, en el que les espècies més freqüentment aïllades van ser: *E. coli* (3.821 aïllats), *S. aureus* (1.715 aïllats), *Enterococcus* (1.093 aïllats), *S. pneumoniae* (708 aïllats), *K. pneumoniae* (628 aïllats) i *Ps. aeruginosa* (544 aïllats) (Nogueira, 2011).

Molts dels microorganismes Gram-negatius més freqüentment relacionats amb les infeccions nosocomials presenten problemes importants de resistència adquirida als antimicrobians (Taules 1.6, 1.7 i 1.8):

1. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter* (Enterobacteris) (Taula 1.6). L'existència de soques d'enterobacteris, sobre tot d'*E. coli* i *K. pneumoniae*, productores dels enzims anomenats KPC (carbapenemasa de *K. pneumoniae*) i NDM-1 (New Delhi metal·lo-beta-lactamasa 1), que s'estan estenen per tot el món, suposa una gran amenaça. Aquests enzims condueixen a la resistència d'aquests bacteris a tots els antibiòtics beta-lactàmics, incloent els carbapenems, i també a les fluoroquinolones, i als aminoglucòsids. Les NDM-1 es van detectar primer en la Índia, Pakistan i Bangladesh, i després en el Regne Unit. Els gens que les codifiquen (blaNDM-1) es localitzen en plasmidis i es transmeten molt fàcilment a altres bacteris (Díaz *et al.*, 2009, 2010; Ruiz de Alegría *et al.*, 2011; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Berrazeg *et al.*, 2013, 2014; Oteo *et al.*, 2014a, 2014b; Bachman *et al.*, 2015; Tängdén & Giske, 2015).

2. *Pseudomonas* (Taula 1.7). Aquest gènere presenta una alta prevalença entre els patògens oportunistes, causant moltes IRAS. *Ps. aeruginosa* i *Ps. cepacia* són les més freqüents, destacant també per la resistència a antibiòtics i per la seva persistència clínica en les infeccions d'UCI, grans cremats i muscoviscidosis. La resistència a molts

antimicrobians es deu a l'acció concertada de múltiples bombes d'eflux, codificades per gens de resistència cromosòmics i a la baixa permeabilitat de la paret cel·lular bacteriana. La resistència actual de *Ps. aeruginosa* en la Comunitat Valenciana, excloent la intrínseca, és la següent: aztreoam 12%, ceftazidima 8%, piperacil·lina/tazobactam 8%, imipenem 13%, amikacina 5% i ciprofloxacino 21%. (Cabot *et al.*, 2011; Santos & Gobernado, 2011a, 2011b; Murray *et al.*, 2014).

3. *Stenotrophomonas maltophilia*. Bacteri Gram-negatiu, no enterobacteri, que s'ha aïllat de diverses fonts ambientals i hospitalàries i té importància clínica en els malalts immunodeprimits greus, i també en casos de fibrosi quística. L'ús estens de carbapenems als que es resistent pareix haver-se associat amb brots intrahospitalaris. Aquests són els valors de resistència en la Comunitat Valenciana: cotrimoxazol 6%, ciprofloxacino 33%, colistina 36%, ceftazidima 63% i colistina 36% (Santos & Gobernado, 2011a, 2011b).

4. *Burkholderia cepacia*. Bacteri Gram-negatiu, no enterobacteri, que presenta poc risc per les persones sanes, però causa infeccions en els malalts hospitalitzats, sobre tot en els immunodeprimits o els que pateixen malalties pulmonars cròniques, especialment fibrosi quística. És intrínsecament resistent a molts antibiòtics (Santos & Gobernado, 2011a, 2011b).

5. *Acinetobacter baumannii* (Taula 1.8). De les espècies d'*Acinetobacter*, que tantes infeccions causen en les UCI i altres àrees hospitalàries, el més perillós per la seva versatilitat i multiresistència antibiòtica és *A. baumannii*, causant d'un 80% de totes les infeccions per *Acinetobacter*. *A. baumannii* ha sorgit com un patogen nosocomial important en forma de brots i s'ha quedat de manera endèmica en la majoria dels hospitals (Santos & Gobernado, 2011a, 2011b; Fernández-Cuenca *et al.*, 2013; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

6. *Serratia marcescens*. Aquest enterobacteri és un important patogen nosocomial que pot causar una varietat d'infeccions, principalment urinàries i bacterièmies. Es troba en molts nínxols ecològics i és capaç d'infectar plantes i animals. L'emergència i disseminació de soques multiresistents que produeixen BLEEs o metallo-beta-lactamases suposen actualment un perill per la salut pública a nivell mundial (Rieber *et al.*, 2012; Iguchi *et al.*, 2014; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Oteo *et al.*, 2014a, 2014b).

7. *Proteus*. L'espècie més rellevant d'aquest gènere d'enterobacteri és *P. mirabilis*, que es troba habitualment en el sòl, aigües i el tracte intestinal dels mamífers, inclòs l'home. Es un patogen nosocomial que causa nombroses infeccions (del tracte urinari, respiratori, de ferides, i bacterièmies, entre altres). La selecció i disseminació de soques resistents als

INTRODUCCIÓ

beta-lactàmics, productores de distints tipus d'enzims (carbapenemeses, cephalosporinases) representa una amenaça hospitalària rellevant (D'Andrea *et al.*, 2011; Tibbets *et al.*, 2008; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Oteo *et al.*, 2014a, 2014b).

Taula 1.6. Percentatges de soques d'*E. coli* i *K. pneumoniae* productores de BLEEs, aïllades en Espanya en 2006 (modificat de Díaz *et al.*, 2010; Ruiz de Alegria *et al.* 2011; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

Antimicrobià	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Cefoxitina	11,9	12,9
Imipenem, meropenem	0	0
Ertapenem	0	1,8
Amoxicil·lina-clavulàmic	30,7	95,7
Piperacil·lina-tazobactam	11,4	44,4
Ciprofloxacino	70,9	62,2
Gentamicina	21,7	50,6
Tobramicina	24,0	60,5
Amikacina	2,0	1,9
Cotrimoxazol	63,9	72,8

Taula 1.7. Activitat d'antimicrobians front a soques de *Ps. aeruginosa* (n: 190) causants de bacterièmia en un estudi multicèntric espanyol (modificat de Cabot *et al.*, 2011).

Antimicrobià	Soques resistents (%)*
Ceftazidima	23,7
Cefepima	38,4
Aztreonam	32,6 (98,4)
Piperacil·lina-tazobactam	13,7 (27,9)
Imipenem	32,1
Meropenem	22,6 (30,0)
Ciprofloxacino	28,4 (34,2)
Gentamicina	21,1
Tobramicina	18,4
Amikacina	1,6 (6,3)
Colistina	3,2 (1,1)

* Inclou soques resistents i intermèdies, segon els punts de tall del CLSI o, entre parèntesi, de l'EUCAST.

Taula 1.8. Percentatge de resistència d'*Acinetobacter baumannii* als antimicrobians en Espanya en l'any 2010 (modificat de Fernández-Cuenca *et al.*, 2013; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

Agent quimioteràpic	Soques resistents (%)
Piperacil·lina	93
Ceftazidima	83
Sulbactam	53
Imipenem	48
Meropenem	43
Gentamicina	96
Tobramicina	79
Amikacina	65
Doxiciclina	68
Minociclina	34
Tigeciclina	24
Ciprofloxacino	98
Rifampicina	51
Colistina	0

1.2.8. SISTEMES DE VIGILÀNCIA DE LA RESISTÈNCIA

Existeixen diferents formes d'abordar la vigilància de les resistències, cadascuna amb virtuts i inconvenients: (i) col·lectar les soques i estudiar la seva sensibilitat de forma centralitzada en un únic laboratori (vigilància activa), i (ii) utilitzar les dades generades per cada laboratori amb la seva pròpia metodologia (vigilància passiva o antibiogrames acumulats) (Oteo *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2007; Nogueira, 2011; Pujol & Limón, 2013).

La vigilància activa es fonamenta en l'obtenció, en nombre representatiu, d'aïllats de microorganismes concrets, de diferents laboratoris, d'un o varis països, i la seva remissió a un laboratori centralitzat, on es realitzen els estudis de sensibilitat corresponents o bé es realitzen en els distints centres participants, seguint normes concretes d'actuació i qualitat. Aquest sistema té com avantatge que facilita la comparació de resultats, a l'unificar la metodologia i els criteris d'interpretació, i permet eliminar duplicats de pacients, disposar de paràmetres clínics i la realització, amb les soques conservades adequadament, d'estudis a posteriori. Contràriament, la vigilància activa és difícil de mantenir en el temps. Moure

INTRODUCCIÓ

un volum elevat i representatiu de casos té un elevat cost. Aquests fets fan que la majoria d'estudis opten per analitzar una mostra dels aïllaments de cada laboratori, o seleccionar un grup reduït de microorganismes. En aquest disseny, la selecció dels centres i de les soques que es van a incloure té una importància capital si es desitja tindre una mostra representativa de la població estudiada.

La segona (vigilància passiva), que aprofita la informació que es genera en cada laboratori (a l'estudiar amb mètodes propis les seues pròpies soques), té com avantatges: (i) la ràpida obtenció d'un gran nombre de resultats de la pràctica totalitat de les soques aïllades, (ii) és més fàcil d'assegurar la seva permanència en el temps, i (iii) és més barata, sino es té en compte la inversió inicial en la comunicació dels sistemes d'informació, que pot ser elevat. A més, pot utilitzar-se com sistema d'alerta precoç de l'aparició i disseminació de la resistència per la disponibilitat, pràcticament instantània, dels resultats. Les principals limitacions es relacionen amb la variabilitat dels mètodes utilitzats en la detecció de la resistència, els diferents criteris d'interpretació de resultats, l'existència de diversos aïllats d'un mateix pacient i la no disponibilitat de les soques per a estudis posteriors. Per això, es necessari la realització periòdica de controls de qualitat externs per a validar els resultats i que els fagen comparables amb els obtinguts en altres centres.

La majoria dels programes de vigilància activa de la resistència a antibiòtics en el món han sigut desenvolupats i finançats per la iniciativa privada; en concret, per la indústria farmacèutica. Un dels més destacats va ser l'iniciat en 1992, patrocinat per la farmacèutica Glaxo-Smith-Kline, i que es va anomenar Alexander Project. Es tracta d'un estudi internacional, multicèntric i longitudinal dels patògens respiratoris més comuns (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis*). Patrocinat per Bristol-Myers Squibb, en 1997 s'inicia el Projecte SENTRY "Antimicrobial Surveillance System", d'àmbit internacional, que recull dades de sensibilitat de patògens nosocomials i comunitaris implicats en distintes infeccions. En 1999, s'inicia el projecte PROTEK ("Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin"), que finançat per Aventis, analitza aïllats d'origen respiratori, amb especial atenció a la telitromicina, i inclou aïllats de *Legionella*. També en aquest any s'inicia el projecte MYSTIC ("Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection"), patrocinat per Astra-Zeneca, centrat en els malalts hospitalaris que utilitzaven carbapenems (especialment meropenem), i en la comparació amb altres agents antimicrobians d'ampli espectre, així com en la monitorització dels nivells de consum dels centres participants (Nogueira, 2011).

Baix l'emparament d'institucions oficials, "Centers for Disease Control" (CDC) i de la Unió Europea (UE), a finals dels anys 90 es desenvolupen dos grans sistemes de vigilància: INSPEAR i EARSS. En 1998 es va iniciar en EEUU, impulsat pel programa d'infecció hospitalària dels CDC, el denominat "International Network for the Study and Prevention of Emerging Antimicrobial Resistance" (INSPEAR), en el que col·laboren microbiòlegs i epidemiòlegs hospitalaris d'EEUU i Europa, amb la fi de detectar precoçment patògens emergents i facilitar una ràpida informació per desenvolupar i implementar intervencions pel control de la infecció (Rice, 2008).

Paral·lelament, la UE inicia el projecte EARSS ("European Antimicrobial Resistance Surveillance System") que pretén reduir la resistència a antimicrobians mitjançant l'elaboració de bases de dades globals que permeten avaluar i comparar la resistència a antibiòtics en els distints estats membres de la UE al llarg del temps, així com facilitar l'adopció de noves directrius en l'ús d'antibiòtics. A més, en 2002, es posa en funcionament el "European Surveillance of Antimicrobial Consumption" (ESAC) per contribuir al coneixement fiable del consum d'antibiòtics en els diferents estats membres i la seva relació amb les dades de resistència. Espanya participa en aquesta iniciativa des de l'any 2002. En l'informe corresponent a l'any 2009, es va recollir informació d'un total de 8.509 aïllats procedents de 33 laboratoris, distribuïts en 708 soques de *S. pneumoniae*, 1.715 de *S. aureus*, 3.821 d'*E. coli*, 1.093 d'*Enterococcus*, 628 de *K. pneumoniae* i 544 de *Ps. aeruginosa* (Nogueira, 2011).

Altra de les ferramentes fonamentals pel control de la infecció nosocomial és la monitorització periòdica de microorganismes sentinella. La selecció d'aquests patògens deu realitzar-se segons l'epidemiologia local de cada institució (característiques de la població atesa, activitats assistencials, nombre de llits, brots previs que han ocorregut en l'hospital, etc.) i deuen actualitzar-se amb la informació disponible d'àmbit nacional (aparició de brots en altres àrees, emergència de nous mecanismes de resistència, importació de casos aïllats de patògens multiresistents o nous patògens, etc.). Per aquest motiu es poden diferenciar quatre grups de microorganismes sentinella, que poden tindre estratègies de detecció i informació diferents: (i) espècies bacterianes amb perfils de resistència rellevants, (ii) microorganismes en els que la seva capacitat de transmissió intrahospitalària entre individus està ben documentada, (iii) patògens de típica adquisició ambiental, i (iv) qualsevol patògen significatiu per la seva acumulació temporal o espacial (Taula 1.9) (López-Cerero *et al.*, 2013). Els bacteris tenen un paper protagonista per la seva major freqüència i dificultat de control respecte a altre tipus d'agents etiològics.

INTRODUCCIÓ

Entre els microorganismes sentinella cal destacar la presència d'espècies d'enterobacteris (fonamentalment dels gèneres *Klebsiella* i *Enterobacter*), i altres espècies Gram-negatives (*Ps. aeruginosa*, *A. baumannii*, *B. cepacea* i *S. maltophilia*).

Taula 1.9. Grups de microorganismes sentinella que amb més freqüència s'utilitzen pel control de la infecció nosocomial (modificat de López-Cerero *et al.*, 2013).

Microorganismes (característiques rellevants)
1. Bacteris multiresistents
<i>Kebsiella/Enterobacter</i> spp. (productores de BLEEs/carbapenemases) <i>Pseudomonas eeruginosa</i> (productor de carbapenemasa) <i>Acinetobacter baumannii</i> (carbapenems ^R) <i>Staphylococcus aureus</i> (meticil·lina ^R , glucopèptids ^R , linezolid ^R) <i>Staphylococcus coagulasa negatiu</i> (glucopèptids ^R , linezolid ^R) <i>Enterococcus faecalis/E. faecium</i> (glucopèptids ^R) <i>Streptococcus penumoniae</i> (penicil·lina ^R alt nivell, C3G ^R) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (isoniacida ^R + rifampicina ^R)
2. Patògens de possible adquisició nosocomial de persona a persona
<i>Clostridium difficile</i> (toxigènic) Norovirus, astrovirus Adenovirus (serotipus 8 i 19) Virus sincitial respiratori, virus influenza VIH, VHB, VHC
3. Patògens d'adquisició de font ambiental
<i>Aspergillus</i> spp. <i>Legionella pneumophila</i> Mycobacteris (espècies de creixement ràpid)
4. Altres
<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

R: resistent

C3G: cefalosporines de tercera generació

1.2.9. XARXA DE VIGILÀNCIA MICROBIOLÒGICA DE LA COMUNITAT VALENCIANA (RedMIVA)

La vigilància en Salut Pública té per objecte la recollida sistemàtica, l'anàlisi i la interpretació de dades sobre esdeveniments de salut específics que afecten a una població, seguit de la difusió oportuna d'aquestes dades als responsables de la prevenció i control.

Els laboratoris de microbiologia desenvolupen una important funció en la vigilància epidemiològica, no sols en la realització de proves diagnòstiques, sino també pel subministre d'aquesta informació a les unitats de vigilància epidemiològica. Està demostrat que quan es combinen les dades obtingudes en les unitats de microbiologia i la declaració de casos, augmenta la sensibilitat dels sistemes de vigilància a més del 90%, a la vegada que s'incrementen els valors predictius positius (Oteo *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2007; Nogueira, 2011; Pujol & Limón, 2013).

En diversos estats europeus i en EEUU, en els últims anys s'han implementat sistemes electrònics que, generalment, inclouen un nombre limitat de laboratoris i que recullen sols parcialment la informació generada pels servicis de microbiologia. Models d'aquestes característiques s'han desenvolupat en Alemanya, EE.UU, Irlanda, Suècia i Holanda, amb la fi de contribuir a una millora de vigilància de malalties infeccioses i a la seva ràpida detecció.

Des de 2004, la Conselleria de Sanitat de la Comunitat Valenciana està desenvolupant un sistema electrònic de vigilància epidemiològica i anàlisi (AVE) que té com a finalitat recollir en temps real les dades de les malalties de declaració obligatòria, d'alertes, i el seu anàlisi i difusió de forma automatitzada. En aquest sistema s'integra, a partir de 2006, la RedMIVA, un sistema d'informació orientat a la vigilància i la investigació, que recull diàriament tots els resultats generats pels servicis de microbiologia de tota la xarxa pública de la CV, els emmagatzema, analitza en un sistema centralitzat i, posteriorment, difon la informació generada a les persones o institucions interessades (González *et al.*, 2008; Nogueira, 2011; RedMIVA, 2011).

L'objectiu de la RedMIVA es disposar de la informació microbiològica en un únic sistema que permeti detectar en temps real la circulació dels diferents microorganismes i els seus patrons de presentació, identificació de malalties emergents, així com nous marcadors epidemiològics, i definir patrons de resistència a antimicrobians. Tot això amb la fi de recolzar la vigilància epidemiològica i la presa de decisions dels distints comitès hospitalaris responsables del control de les malalties infeccioses (RedMIVA, 2011; Sahuquillo *et al.*, 2011a).

Des de 2007, la Comunitat Valenciana disposa, regularment, de la informació d'aïllats i patrons de resistència de tots els aïllats que es detecten en els laboratoris de microbiologia de la xarxa pública. Aquesta informació està disponible per a clínics, microbiòlegs, epidemiòlegs i preventivistes en una plataforma web i mitjançant informes semestrals que es recullen en el Sistema d'Informació Ambulatòria (SIA). Encara que la RedMIVA

INTRODUCCIÓ

constitueix una important ferramenta de gestió de la informació i del coneixement, la seva rellevància i futur sols dependrà del valor afegit que li donen gestores i usuaris (González *et al.*, 2008; Nogueira, 2011).

2. OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

2.1. OBJECTIUS

Segons els antecedents exposats anteriorment, en el present treball es va plantejar l'estudi de la qualitat microbiològica de les verdures i hortalisses comercialitzades en establiments de la ciutat de València, tan en supermercats com en tendes especialitzades, amb l'objectiu d'obtenir informació rellevant sobre potencials riscos per la salut del consumidor. Per això es plantejaren dos objectius:

- (i) La determinació de bacteris coliformes i aïllament d'enterobacteris en mostres de verdures i hortalisses, i la seva identificació a nivell d'espècie.
- (ii) Estudi de la presència de resistències a diferents quimioteràpics antibacterians en les espècies aïllades.

2.2. JUSTIFICACIÓ

Els objectius plantejats en la present tesi doctoral deriven de la confluència de diverses qüestions àmpliament detallades en la introducció, i que s'indiquen a continuació:

1. Els enterobacteris, i els coliformes en particular, són responsables d'una àmplia varietat d'infeccions nosocomials, que en els últims anys se estan estenen de l'àmbit hospitalari al comunitari. Moltes espècies d'enterobacteris, no sent patogèniques, poden considerar-se com patògens oportunistes, capaces de causar infeccions en individus immunocompromesos per diferents causes: tractaments immunosupressors en pacients trasplantats o amb patologies oncològiques, persones amb malalties del sistema immunitari (infeccioses com la SIDA, o genètiques), persones debilitades per patir altres malalties (diabetis, etc.), pacients amb intervencions quirúrgiques agressives que destrueixen les barreres físiques corporals que impedeixen l'entrada de microorganismes al medi intern, persones d'edat avançada, població infantil, etc. Dita població, susceptible a la infecció per bacteris oportunistes, està augmentant molt en les últimes dècades com conseqüència, i paradoxalment, dels avanços mèdics, que permeten la supervivència de cada vegada major nombre de persones amb distintes patologies, així com durant períodes de temps cada vegada més llargs.
2. El tractament d'aquestes infeccions nosocomials o comunitàries se està fent cada vegada més complicat, degut a la aparició de bacteris resistents als agents quimioteràpics usats en clínica. Aquest fenomen està adquirint proporcions alarmants, ja que (i) és la causa de freqüents fracassos terapèutics, i (ii) obliga a la indústria farmacèutica a la contínua recerca de nous agents quimioteràpics o a la

OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

millora dels existents. L'aparició i selecció de soques resistents és un fenomen proporcional a l'ús d'antibiòtics, de manera que es pot suposar que en un futur els antibiòtics actualment útils, poden deixar de ser-ho progressivament, a pesar dels esforços que es realitzen per un ús racional dels mateixos.

3. Les resistències als antibiòtics es poden propagar entre les poblacions bacterianes de manera molt ràpida i eficient, entre soques de la mateixa o de diferents espècies. Els bacteris són genèticament molt plàstics, i han desenvolupat diferents mecanismes d'intercanvi genètic, que permeten la transmissió dels determinants de resistència de manera eficient entre poblacions microbianes, i els individus resistents són seleccionats fàcilment per la presència dels antibiòtics que inhibeixen als bacteris sensibles. Açò ha obligat al establiment de xarxes hospitalàries de vigilància epidemiològica que s'ocupen de detectar l'aparició de les resistències i la seva disseminació.
4. L'intestí humà està constituït per una complexa comunitat de microorganismes, considerats actualment com l'últim òrgan humà descobert (microbioma o més concretament microbiota intestinal), per els múltiples efectes que té sobre la salut de les persones. Aquest ecosistema microbià és el substrat ideal, per la densitat microbiana i la variabilitat genètica de les espècies que el constitueixen, per l'intercanvi de determinants de resistència entre bacteris, tant comensals com patògens. La selecció de soques resistents està garantida en la comunitat per la utilització dels antibiòtics molt a sovint.
5. Els enterobacteris, i els coliformes, inclouen espècies presents en la microbiota intestinal com comensals habituals o al menys transitoris; de fet la colimetria és una prova rutinària per detectar contaminació fecal d'aigües i aliments. Per altra banda, molts enterobacteris tenen la capacitat de sobreviure o inclòs multiplicar-se en superfícies vegetals (verdures i hortalisses), bé per ser el seu hàbitat natural (bacteris epifítics) o per contaminar els vegetals a partir de material de origen animal (aigua de reg contaminada, utilització de fem com adob, etc.).
6. Els enterobacteris presents en els vegetals poden presentar resistències als antibiòtics, generades per distintes causes. La utilització massiva de antibiòtics en ramaderia així com de plaguicides en agricultura, permeten tant la contaminació dels vegetals amb bacteris resistents, així com la selecció de resistència en els bacteris de la fillosfera.

7. La contaminació d'aliments amb bacteris resistents als antibiòtics, o els seus determinants de resistència, permeten la seva entrada a la cadena alimentària i per tant al consumidor, on les resistències poden transmetre's a la microbiota comensal i/o patògena del mateix. En aquest sentit, el consum de productes vegetals que es consumeixen directament sense tractament previ, com és el cas de moltes verdures i hortalisses, representa una via d'entrada de bacteris resistents viables a l'intestí humà, on les resistències poden transmetre's fàcilment a altres microorganismes, i contribuir al greu problema de la disseminació de resistències entre la població.

En conseqüència amb l'exposat abans, l'objectiu general del present treball ha sigut la determinació de la càrrega de coliformes en productes vegetals que es consumeixen frescos, i l'aïllament d'enterobacteris, no sols pel potencial perill de la presència de bacteris patògens o patògens oportunistes pel consumidor, especialment el consumidor immunodeprimit, sinó per la presència de bacteris resistents, que encara sent poc perillosos pel consumidor pel seu caràcter no patogen (o per la baixa càrrega microbiana dels vegetals), poden contribuir, una vegada ingerits, a la disseminació de les resistències entre la microbiota del consumidor, i per tant, en la comunitat. Aquest fenomen pot ocórrer en el consumidor sense que aquest presenti signe de malaltia o infecció, pel que pot considerar-se, tal com es proposa en aquesta tesi doctoral, com un problema silenciós de seguretat alimentària.

Com material d'estudi s'han seleccionat una sèrie de verdures i hortalisses que habitualment poden consumir-se crues (tomata, enciams, rúcula, canonges, etc.), adquirides en distints establiments de la ciutat de València i els seus voltants, ja que la zona de l'horta de València es caracteritza, a més de la qualitat i quantitat de la producció hortícola, per l'ús de pràctiques agrícoles (com l'ús de fem com adob) que afavoreixen la contaminació dels vegetals amb bacteris d'origen animal. Hi ha que indicar també que l'estudi se ha realitzat tant amb verdures i hortalisses cultivades de manera estàndard o convencional (no ecològica), com amb productes ecològics (orgànics) i també amb vegetals processats (rentats, tallats i envasats) llestos per consumir directament pel consumidor (productes de quarta gamma). Com antibiòtics elegits per detectar la presència de resistències s'han utilitzat onze agents quimioteràpics habitualment utilitzats en clínica pel tractament d'infeccions per bacteris Gram-negatius, com és el cas dels enterobacteris, tal com s'ha descrit detalladament en la introducció. Els onze agents utilitzats han sigut:

OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

- Ampicil·lina i amoxicil·lina/clavulànic (dos antibiòtics del grup de les penicil·lines, beta-lactàmics inhibidors de la síntesi de mureïna, i un inhibidor de beta-lactamases)
- Ceftazidima i cefotaxima (cefalosporines de tercera generació, també beta-lactàmics, inhibidors de la biosíntesi de mureïna)
- Ciprofloxacino (agent del grup de les quinolones, inhibidors de la replicació de l'ADN a l'inhibir a l'ADN girasa bacteriana)
- Estreptomicina i gentamicines (antibiòtics aminoglicosídics, inhibidors de la síntesi proteica)
- Cloramfenicol (inhibidor de la síntesi proteica)
- Nitrofurantoïna (nitroderivat que desnaturalitza l'ADN)
- Clotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim, inhibidors sinèrgics de la síntesi d'àcid fòlic)
- Tetraciclina (inhibidor de la síntesi de proteïnes)

Aquest grup d'antibiòtics inclou molècules molt distintes entre sí, que pertanyen als principals grups d'antimicrobians efectius front a bacteris Gram-negatius, amb mecanismes d'acció molt variats i front als quals els bacteris poden desenvolupar també distints mecanismes de resistència. Amb l'elecció dels productes vegetals i els antibiòtics dalt citats, s'ha abordat el treball plantejat en aquesta tesi doctoral.

Finalment hi ha que indicar que la metodologia utilitzada, basada en tècniques microbiològiques clàssiques (descrites en seccions posteriors d'aquesta tesi doctoral), han permès en ocasions, l'aïllament i identificació de bacteris Gram-negatius que no pertanyen a la família dels enterobacteris, que també han sigut inclosos en l'estudi de la resistència als quimioteràpics.

3. RESULTATS

RESULTATS

3.1. TREBALLS COMPENDIATS I APORTACIÓ

Els resultats obtinguts durant la realització d'aquesta tesi doctoral s'han recollit en un total de set publicacions, les referències dels quals es detallen a continuació, ordenades per ordre cronològic, i les publicacions completes componen l'apartat 3.1 d'aquesta tesi doctoral.

Publicació 1

Falomir MP, Sebastià C, Gozalbo D and Rico H (2011). Detection and antibiotic susceptibility of coliform bacteria in fresh vegetables. In: "*Microorganisms in Industry and Environment. From Scientific and Industrial Research to Consumer Products*" (Ed. A. Méndez Vilas). World Scientific Publishing (London, UK), pp. 372-376.
ISBN: 978-981-4322-10-2.

Publicació 2

Falomir MP, Gozalbo D and Rico H (2010). Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. In "*Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*" (Ed. A. Mendez Vilas). Formatex Research Center (Badajoz, Spain), Vol. 2, pp. 1175-1181.
ISBN: 978-84-614-6195-0.

Publicació 3

Rico H, Gozalbo D, Sebastià C and **Falomir MP** (2012). *Enterobacter cloacae* in fresh vegetables: A potential carrier of antibiotic resistances to consumers. *Food Studies: An Interdisciplinary Journal*, 2: 1-8.
ISSN: 2160-1933.

Publicació 4

Falomir MP, Rico H and Gozalbo D (2013). *Enterobacter* and *Klebsiella* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10: 1002-1007.
ISSN: 1535-3141.

RESULTATS

Publicació 5

Rico H, Gozalbo D, Sebastiá C and **Falomir MP** (2014). Resistances to beta-lactam antibiotics in *Enterobacteriaceae* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain). In: “*Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Status and Current Trends*” (Ed. A. Mendez Vilas). Wageningen Academic Publishers (Wageningen, The Netherlands), pp. 294-298.
ISBN: 978-90-8686-243-6.

Publicació 6

Falomir MP, González P, Rico H and Gozalbo D (2014). Resistances to chemotherapeutic agents in *Enterobacteriaceae* isolates from organic fresh vegetables marketed in Valencia (Spain). *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 5: 39-49.
ISSN: 2165-896X.

Publicació 7

Falomir MP, Gozalbo D and Rico H (2014). Consumption of fresh vegetables: a risk factor for development of opportunistic bacterial infections in the elderly. En: “*Calidad de vida, cuidadores e intervención para la mejora de la salud en el envejecimiento*” Vol. II, pp. 39-44. Ed. ASUNIVEP (Asociación Universitaria de Educación y Psicología, Almería, España).
ISBN: 878-84-617-0181-0.

Les set publicacions tenen un caràcter unitari, ja que comparteixen totes un tema únic, que és el que defineix l'objectiu d'aquesta tesi doctoral: determinació de càrrega de bacteris coliformes en mostres de vegetals frescos comercialitzats en la ciutat de València i rodalies, la identificació de les espècies d'enterobacteris aïllades i la determinació en els aïllats de les resistències a onze dels agents quimioteràpics més freqüentment utilitzats en clínica pel tractament de bacteris Gram-negatius. Al tractar-se de publicacions cronològiques, en cadascuna de les publicacions s'ha incrementat el nombre i varietat de mostres analitzades, així com el seu origen (cultivades convencionalment, orgàniques o ecològiques, de quarta gamma, o inclòs mostres d'amanides servides en menjadors d'escoles, escoletes i establiments de menjar preparat). A continuació es fa un resum de les aportacions més rellevants de cada publicació.

Les dos primeres publicacions (publicació 1 i publicació 2) recullen resultats inicials d'aquesta tesi (la publicació 2 inclou un nombre més elevat de mostres, així com mostres d'amanides de menjadors escolars), i constitueixen una descripció general de la situació sobre la temàtica en estudi, que es pot resumir de la següent manera: (i) una proporció significativa dels productes analitzats presenta una contaminació significativa per bacteris coliformes, (ii) les soques aïllades no corresponen a espècies patogèniques, però la gran majoria poden comportar-se com patògens oportunistes, que poden causar infeccions en la població immunodeprimida o debilitada per diferents causes, i (iii) les soques aïllades presenten una elevada freqüència de resistències als antibiòtics més comuns (com ampicil·lina i amoxicil·lina/clavulànic), mentre que la resistència a altres antibiòtics és més infreqüent, però significativa en molts casos; cal destacar la detecció de soques multiresistents a varis antibiòtics (fins quatre o cinc dels agents estudiats). Aquestes publicacions constitueixen la primera descripció sobre la presència d'enterobacteris en productes vegetals frescos en la Comunitat Valenciana (en concret, l'àrea de la ciutat de València), així com de la presència de bacteris amb resistències (i multiresistències) als antibiòtics, i es discuteixen les possibles causes d'aquesta contaminació (entre les que està l'ús d'adobs d'origen animal, com el fem), i potencials riscos pel consumidor, al actuar com a vehicles de transmissió d'enterobacteris des de les granges o camps de cultiu al consumidor. A més, aquests resultats fan evident que el rentat convencional d'aquests productes no elimina la càrrega bacteriana (present en amanides), ni tan sols en els productes processats industrialment (quarta gamma), pel que les mesures preventives són molt importants per tal d'evitar la contaminació en origen (als camps de cultiu).

En la tercera publicació es fa un anàlisi detallat de l'espècie *Enterobacter cloacae* com bacteri més freqüentment aïllat en els productes analitzats (el 40% de tots els aïllats, aproximadament). Aquesta espècie està present en moltes de les mostres vegetals analitzades, independentment del tipus de vegetal i de cultiu, incloses les amanides. Els aïllats d'*E. cloacae* presenten resistències significatives a bona part dels antibiòtics utilitzats, especialment front a les penicil·lines, i cal destacar que algunes soques són multiresistents a varis (4-5 antibiòtics). Aquesta observació té implicacions significatives, ja que és un patogen oportunista que actualment està considerat com patogen emergent, responsable de nombroses infeccions nosocomials (en hospitals espanyols, inclosos els de la Comunitat Valenciana), i les soques multiresistents serveixen com bacteris sentinella per detectar la disseminació de les soques multiresistents a l'àmbit hospitalari. Aquests resultats concorden en la disseminació mundial de soques d'*E. cloacae* resistents a beta-

RESULTATS

lactamases, i remarquen la possible implicació d'aquesta espècie com potencial transmissora de determinants de resistència, a través del consum de vegetals frescos, a la microbiota del consumidor a través de mecanismes de transferència gènica horitzontal entre bacteris. Aquest procés pot ser especialment rellevant si es té en compte que les soques d'*E. cloacae* poden colonitzar, o al menys sobreviure transitòriament, en l'intestí humà, un ecosistema microbià molt complex, ideal pels processos de recombinació genètica entre bacteris. Aquesta publicació és la primera que descriu aquesta situació i les seves implicacions pel consumidor, a nivell comunitari i hospitalari, en la Comunitat Valenciana.

La quarta publicació es centra en els gèneres *Klebsiella* i *Enterobacter*, que són els més importants en quan a la seva presència en el productes vegetals frescos. Les espècies d'aquests gèneres representen aproximadament el 68% de tots els aïllats identificats. A més, inclouen espècies oportunistes que poden causar una gran varietat d'infeccions en persones immunodeprimides i que representen un problema hospitalari per ser freqüents agents etiològics d'infeccions nosocomials; entre aquestes espècies cal destacar *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca*, i dintre el gènere *Enterobacter*, a més d'*E. cloacae* (objecte de la publicació 3) s'han identificat aïllats d'*E. aerogenes*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, i *E. sakazakii* (actualment *Cronobacter* spp.) . En aquesta publicació és fa un estudi de les resistències al principals agents quimioteràpics que presenten els aïllats d'aquestes espècies, i els resultats confirmen una elevada freqüència de resistència a alguns quimioteràpics així com algunes soques amb multiresistències. Tal com s'ha indicat anteriorment per *E. cloacae*, les soques multiresistents dels gèneres *Klebsiella* i *Enterobacter* serveixen com bacteris sentinella per detectar la disseminació de les soques multiresistents a l'àmbit hospitalari. A més de confirmar i ampliar les observacions anteriorment descrites sobre el risc pel consumidor i la necessitat de controlar la contaminació dels productes vegetals frescos, en aquesta publicació s'introdueix un nou concepte per definir el possible impacte del consum d'aquests productes vegetals frescos en el consumidor i en la comunitat: *problema silencios de seguretat alimentària*. Aquest concepte es refereix al fet de que el consum d'aquests aliments pot contribuir a la disseminació de resistències en la microbiota (comensal o patogènica) del consumidor, sense causar signes de malaltia o d'infecció, i d'aquesta manera contribuir, de manera silenciosa o no observable, a la disseminació de resistències en la comunitat i per tant, contribuint a agreujar el problema de les resistències als antibiòtics. Aquesta publicació, a banda de proposar per primera vegada el concepte de problema silencios de seguretat

alimentària, descriu per primera vegada aquesta problemàtica en la Comunitat Valenciana, situació que és aplicable als productes vegetals que es consumeixen frescos a nivell mundial.

En la cinquena publicació es presenta un estudi de les resistències que presenten tots els aïllats, dels productes vegetals frescos, als quatre antibiòtics beta-lactàmics utilitzats: dos penicil·lines (ampicil·lina i amoxicil·lina/clavulànic) i dos cefalosporines de tercera generació (cefotaxima i ceftazidima). Es va escollir el grup d'antibiòtics beta-lactàmics ja que és un grup ampli d'agents quimioteràpics i inclou antibiòtics molt utilitzats en clínica, però que difereixen en el temps que duen utilitzant-se, de manera que les dues penicil·lines s'utilitzen àmpliament des de fa varies dècades i el seu consum ha sigut molt considerable, mentre que les dues cefalosporines de tercera generació són més recents i el seu consum ha estat menor si es compara amb les penicil·lines. En conseqüència, aquestes diferències podrien reflectir-se en diferents freqüències de resistència. Els resultats van ser molt aclaridors, ja que es va trobar una concordança entre el consum d'antibiòtics i la freqüència d'aïllats resistents: la freqüència de resistència a ampicil·lina i amoxicil·lina/clavulànic era elevada (75% i 68%, respectivament), mentre que la freqüència a les cefalosporines va ser baixa (3,5% en el cas de la cefotaxima, i 0,5% en el cas de la ceftazidima). Per tant, aquesta publicació demostra (i) que la quantificació de les resistències als antibiòtics beta-lactàmics es un paradigma que pot servir per pronosticar o predir l'evolució futura de les resistències als altres antibiòtics menys utilitzats, i (ii) que la determinació de resistències en soques aïllades dels productes vegetals frescos pot servir d'indicador de la penetració mediambiental de les resistències, data molt important i complementària al seguiment de les resistències a nivell hospitalari.

La sisena publicació recull els resultats obtinguts al analitzar els enterobacteris presents en els productes vegetals frescos cultivats ecològicament (orgànics). Els resultats mostraren que no hi ha diferències rellevants amb els productes vegetals cultivats convencionalment, pel que fa a la càrrega bacteriana, espècies aïllades i resistències als antibiòtics. Per tant, es confirma que el consum d'aquests productes, des de el punt de vista microbiològic, pot representar un potencial risc pel consumidor, com s'ha comentat anteriorment, i que poden actuar com vehicles de transmissió de les resistències des del camp de cultiu fins la microbiota del consumidor, contribuint a la disseminació de les resistències en la comunitat. Donat que el cultiu ecològic no utilitza productes químics (herbicides, plaguicides, etc.) aquests resultats suggereixen que la presència de bacteris resistents pot deure's a l'ús d'adob d'origen animal (fem) com fertilitzant. Aquesta

RESULTATS

publicació, centrada en l'estudi de la presència d'enterobacteris i les seves resistències als antibiòtics en productes vegetals ecològics de la Comunitat Valenciana, constitueix una de les publicacions pioneres sobre aquesta temàtica a nivell internacional, i en la mateixa es proposa que l'absència, o al menys els baixos nivells de bacteris resistents als antibiòtics, hauria de considerar-se com valor afegit a l'hora d'avaluar la qualitat dels vegetals ecològics.

La setena publicació es bastant distinta a les anteriors, encara que manté la mateixa temàtica. No es tracta d'una publicació amb resultats nous, encara que es presenten de manera molt resumida tots els resultats obtinguts sobre la presència d'enterobacteris, i les seves resistències als antibiòtics, en productes vegetals frescos. Abans s'ha indicat el potencial risc del consum d'aquests productes pel consumidor debilitat o immunodeprimit per diferents causes, bàsicament degut a la presència de bacteris oportunistes amb resistències als antibiòtics. Aquesta publicació es centra en la descripció/discussió d'aquests riscos en una població de risc molt concreta: les persones majors (tercera edat), ja que presenten unes característiques que la fan més vulnerable a les infeccions (comorbiditat, polifarmàcia, immunosenescència, alteracions metabòliques pel mal funcionament del fetge i del ronyó, etc.). Per tant, es tracta d'una publicació de discussió i divulgació, basada en els resultats d'aquesta tesi, dirigida fonamentalment als cuidadors de la gent major per tal de assabentar-los dels possibles riscos que el consum de productes vegetals frescos poden tenir per aquesta població, i de les mesures higièniques que cal prendre per minimitzar els riscos. Per tant, aquesta aportació no s'ha recollit estrictament en una publicació de l'àrea de Microbiologia, sinó en una publicació en el camp de la qualitat de vida en la tercera edat.

En els següents apartats d'aquesta tesi s'inclou una còpia completa de cadascuna de les publicacions, així com la representació gràfica de tots els resultats referents a la càrrega de coliformes (Annex I), espècies bacterianes identificades (Annex II), resistències als antibiòtics (Annex III) i multiresistències (Annex IV) en els productes vegetals frescos analitzats.

3.1. PUBLICACIÓ 1

Falomir MP, Sebastiá C, Gozalbo D and Rico H (2011). Detection and antibiotic susceptibility of coliform bacteria in fresh vegetables. In: *“Microorganisms in Industry and Environment. From Scientific and Industrial Research to Consumer Products”* (Ed. A. Mendez Vilas). World Scientific Publishing (London, United Kingdom), pp. 372-376.

ISBN: 978-981-4322-10-2

Detection and antibiotic susceptibility of coliform bacteria in fresh vegetables

M.P. Falomir^{*1}, D. Gozalbo¹, C. Sebastián² and H. Rico¹

¹ Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain

² Laboratorio de Análisis Clínicos, Pasaje Dr. Bartual Moret nº 1, 46010 Valencia, Spain

We have determined the presence of coliform bacteria, as well as their antibiotic susceptibilities, in fresh vegetables. Ten samples of six different fresh vegetables (two kinds of tomato, three of lettuce, and one of carrot) purchased from supermarkets and greengrocer's shops in Valencia city (Spain) were analyzed. Coliforms were isolated in 50% out of the 60 samples. The identified isolates (n: 45) included mainly species belonging to *Klebsiella* (n: 15), *Enterobacter* (n: 20), and other genera, and only one was identified as *Escherichia coli*. Most isolates were resistant to ampicillin, and to amoxicillin/clavulanic acid; although resistances to other chemotherapeutic agents were sporadic, seven isolates showed multiresistance to three/four/five agents. Therefore, microbial contamination of these products with opportunistic pathogens can be considered as a food safety concern, as consumption of fresh vegetables may represent a potential risk for the consumer health, particularly in debilitated or immunocompromised individuals.

Keywords: antibiotic resistances; coliform bacteria; fresh vegetables.

1. Introduction

The consumption of fresh vegetables has been increasing in recent years as consumers strive to eat healthy diets and the availability of these products, up till recently considered as seasonal, has been extended over the whole year. Fresh vegetables normally carry natural non-pathogenic epiphytic microorganisms, but during growth, harvest, transportation and further handling the produce can be contaminated with pathogens from animal and human sources. As most of these products are eaten without further processing, their microbial content may represent a risk factor for the consumer's health and therefore a food safety problem [1-3]. Contamination can arise as a consequence of treating soil with organic fertilisers, such as sewage sludge and manure, and from the irrigation water, as well as from the ability of pathogens to persist and proliferate in vegetables [2,4]. The epidemiology of foodborne disease has changed rapidly over the last decades as, shortly after some major human pathogens were recognized to be spread from animal reservoirs, fresh vegetables have emerged as new vehicles for the transmission of these infectious diseases. Since the early 1990s, awareness of the potential of fresh produce to cause foodborne disease has increased, and reported outbreaks associated with consumption of fresh vegetables have grown steadily. Most of the reported outbreaks of gastrointestinal disease linked to the fresh produce have been associated with bacterial contamination, particularly with members of the *Enterobacteriaceae* family [2,3,5,6].

In addition, the presence of antibiotic resistances both in normal flora and pathogenic microorganisms in fresh vegetables may contribute to horizontal spreading of resistances between different isolates, species and genera. The presence of resistance genes on transferable elements facilitates distribution of resistance and the widespread use of antibiotics allows direct selection or co-selection of co-resistances [7-9]. Hospitals and commercial animal husbandry are prime areas of antibiotic resistance development. The use of large amounts of antibiotics in plant agriculture could lead to a selection of resistant bacteria; applying manure from animal farming to agricultural fields or the use of contaminated water for irrigation could also spread resistant bacteria to plants [10-17]. Bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as vegetal surfaces or human colon. Therefore, the presence of antibiotic-resistant bacteria in fresh vegetables constitutes an additional concern for consumer safety [18-19].

In this work we have determined the presence of coliform bacteria, as well as their antibiotic susceptibilities, in fresh vegetables as an indicator of their microbiological quality and their potential as a risk factor for consumers.

* Corresponding author: e-mail: m.pilar.falomir@uv.es, phone: +34 963543026

2. Materials and Methods

2.1 Vegetables

Ten samples from six different vegetables (two kinds of tomato, three of lettuce, and one of carrot) were studied. All fresh products were purchased from supermarkets and from retail greengrocer's shops in Valencia city (Spain).

2.2 Microbiological methods

Selected samples of each vegetable (2-5 g) were added with nine volumes of Tryptone water (MicroKit, Valdemorillo, Spain) (1/10 dilution) and homogenised in a Classic Masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain). The most probable number of coliforms (MPN) was determined according to standard methods: 1 ml of serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , in Tryptone water) of the homogenates were inoculated by triplicate in Brilliant Green Bile 2% Lactose Broth (BGBLB) (MicroKit, Valdemorillo, Spain). After incubation for 24-28 h at 37 °C the number of positive cultures (determined by turbidity and gas production) were used to determine the MPN/g. Positive cultures were plated on selective media (EMB Levine agar, Liofilchem, Roseto, Italy) to isolate single colonies, which were identified by correlating colonial appearance, Gram stain, oxidase reaction, and biochemical reactions using the BBL Crystal E/NF identification system (Becton Dickinson, Loveton Circle Spark, MA, USA).

Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion [20] according to standard microbiological procedures. Briefly, bacterial suspensions (0.5 turbidity, McFarland Standard, BioMérieux, Madrid, Spain) were plated on Mueller-Hinton agar (Liofilchem, Roseto, Italy), and after addition of antibiotic-containing disks, plates were incubated for 24 h at 37°C. Diameters of the growth inhibition halos were used to determine the resistance/susceptibility to the antibiotics. Disks of eleven antibacterial chemotherapeutic agents (most of them antibiotics) were used in this study (Liofilchem, Roseto, Italy): amoxicillin/clavulanic acid (Augmentine) 30 µg, ampicillin 10 µg, cefotaxime 30 µg, ceftazidime 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, chloramphenicol 30µg, cotrimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) 25 µg, streptomycin 10µg, gentamicin 10 µg, nitrofurantoin 300 µg, and tetracycline 30 µg.

3. Results and Discussion

3.1 Coliform bacteria in fresh vegetables

Ten samples of the six selected fresh vegetables were tested for the presence of coliform bacteria. The term coliform bacteria refers to Gram-negative bacilli that grow in the presence of bile and ferment lactose with production of gas, although the methodology used also allow the detection of non-coliform species belonging to the *Enterobacteriaceae* family as well as some non-enterobacteria Gram-negative species, since mixed bacterial populations are found on vegetables and therefore non-coliform species present in positive cultures in BGBLB tubes are then isolated on EMB-agar plates. In our study all colonies isolated on EMB plates were identified.

Coliforms were isolated in 50% out of the 60 samples analyzed, although only one isolate was identified as *Escherichia coli* (Table 1). The identified species included enterobacteria: *Klebsiella pneumoniae* (n: 5), *Klebsiella oxytoca* (n: 10), *Serratia marcescens* (n: 1), *Serratia rubidaea* (n: 1), *Enterobacter cloacae* (n: 20), *Kluyvera ascorbata* (n: 2), and *Pantoea agglomerans* (n: 3), as well as other bacterial species: *Acinetobacter baumannii* (n: 1) and *Stenotrophomonas maltophilia* (n: 1). As shown in Table 1, in some cases (12 out of 60) the bacterial burden (NMP) of the samples was over the detection limit of the method (>2400 coliforms/g), whereas in 50% of samples the presence of coliform bacteria was under the detection limit (<3 coliforms/g). Carrots were the vegetables more contaminated, followed by the three types of lettuce, whereas both types of tomatoes showed minor content of bacterial burden; these results correlate with the probability of the analysed vegetables to be in contact with the source of contamination during growth: soil, organic fertilisers and irrigation water [1-4]. It should be noted that in the area of Valencia, and in general the Spanish Mediterranean coast, the use of manure and sewage sludge as fertilizers is a common practice. In addition, vegetables from supermarkets were less contaminated with coliform bacteria (11 samples out of 30) as compared to vegetables from retail greengrocer's shops (19 samples out of 30). Besides, previous standard washing of vegetables with water did not significantly affect the results obtained (not shown) indicating that coliform bacteria possess mechanisms for attachment to vegetal surfaces [1,3,4].

Despite the fact that no bacterial pathogens were identified in our study, such as *E. coli* O157:H7 (although the only isolate identified as *E.coli* was not further characterized), *Salmonella* and *Shigella*, the presence in raw vegetables of some opportunistic bacterial pathogens, either as epiphytic flora or as a result of contamination

from soil, animal or human sources (*Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, and others) points out that fresh vegetables may represent a risk factor for infection [1-4] in the expanding immunocompromised population, and therefore consumption of raw vegetables should be considered as a potential food safety concern in particular populations subsets.

Table 1. Bacterial species isolated from fresh vegetables.

Sample	MPN ^(1,2)	Bacterial species ⁽²⁾
Tomato (round) (n = 10)	>2400 (1/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1/10)
	9-43 (1/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/10)
	<3 (8/10)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/10)
Tomato (pear) (n = 10)	>2400 (1/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2/10)
	4-480 (3/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/10)
	<3 (6/10)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/10)
		<i>Kluyvera ascorbata</i> (1/10)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (1/10) <i>Serratia rubidaea</i> (1/10)
Carrot (n = 10)	>2400 (5/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (7/10)
	23-1100 (4/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (5/10)
	>3 (1/10)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2/10)
		<i>Kluyvera ascorbata</i> (1/10) <i>Serratia marcescens</i> (1/10)
Lettuce hearts (n = 10)	>2400 (3/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (4/10)
	23-480 (2/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2/10)
	<3 (5/10)	
Lettuce (roman) (n = 10)	>2400 (2/10)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1/10)
	4-480 (2/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2/10)
	<3 (6/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/10)
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/10) <i>Pantoea agglomerans</i> (1/10)
Lettuce (iceberg) (n = 10)	4-480 (6/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (4/10)
	<3 (4/10)	<i>Escherichia coli</i> (1/10)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (1/10) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1/10)

⁽¹⁾ MPN: most probable number of coliforms/g.

⁽²⁾ The frequency of either the MPN or the bacterial species isolated is indicated in parenthesis.

3.2 Resistance patterns

Antibiotic resistance bacteria or their correspondence resistance determinants are known to spread from animals to humans via the food chain [14,21]. Fresh vegetables that are eaten raw may contribute to this phenomenon, as epiphytic bacteria may develop antibiotic resistances as a consequence of the large amount of antibiotics used in agriculture, and also treating soil with organic fertilisers, such as sewage sludge and manure, and contaminated irrigation water, may lead to vegetal contamination with resistant bacteria from animal and/or human sources [10-17]. Therefore, we determined the presence of resistances to eleven common antibacterial chemotherapeutic agents in all bacterial strains (n: 45) isolated from fresh vegetables (Table 2). Most isolates were resistant to ampicillin (all except the *S. maltophilia* isolate and two *P. agglomerans* isolates) and most of them also to amoxicillin/clavulanic acid (all except the *S. maltophilia* isolate and the three *P. agglomerans* isolates). Resistances to other agents were sporadic: tetracycline (four resistant isolates), nitrofurantoin (four resistant isolates), co-trimoxazole (two resistant isolates), streptomycin (one resistant isolate), cefotaxime (one resistant isolate), and chloramphenicol (one resistant isolate). No resistances were found to gentamicin, ciprofloxacin, and ceftazidime. Only three bacterial isolates (two *P. agglomerans* and the one of *S. maltophilia*) were susceptible to all antibiotics tested, whereas three isolates (two *E. cloacae* and one *S. rubidaea*) were resistant to

three antibiotics, another three isolates (*A. baumannii*, *E. cloacae* and *S. marcescens*) showed multiresistance to four agents, and one isolate (*E. cloacae*) was resistant to five antibiotics (Table 2).

As above mentioned, the bacterial isolates from fresh vegetables include several opportunistic human pathogens, which may cause a variety of infectious diseases in the immunocompromised host and, in addition, antibiotic resistances can be horizontally disseminated, after ingestion by the consumer, to other gut commensal or pathogenic bacteria. Therefore, consumption of fresh vegetables may represent a potential risk factor for the consumer health, particularly in debilitated or immunocompromised individuals, and microbial contamination of these products can be considered as a food safety concern [1-4, 18,19].

Table 2. Resistance patterns of the bacterial species isolated from fresh vegetables.

Species ⁽¹⁾	Resistances ⁽²⁾
<i>A. baumannii</i> (1)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin, Chloramphenicol, Nitrofurantoine
<i>E. cloacae</i> (16)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin, Cefotaxime, Nitrofurantoine, Co-trimoxazole
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin, Co-trimoxazole, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin, Nitrofurantoine
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin, Tetracycline
<i>E. coli</i> (1)	Ampicillin
<i>Kb. oxytoca</i> (8)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin
<i>Kb. oxytoca</i> (2)	Ampicillin
<i>Kb. pneumoniae</i> (4)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin
<i>Kb. pneumoniae</i> (1)	Ampicillin
<i>Kv. ascorbata</i> (2)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin
<i>P. agglomerans</i> (1)	Ampicillin
<i>P. agglomerans</i> (2)	(None)
<i>S. marcescens</i> (1)	Amoxicilin/clavulanic, Ampicillin, Nitrofurantoine, Tetracycline
<i>S. rubidaea</i> (1)	Ampicillin, Streptomycin, Tetracycline
<i>S. maltophilia</i> (1)	(None)

⁽¹⁾ Number of isolates is indicated in parenthesis

⁽²⁾ Only resistances to the eleven chemotherapeutic agents assayed are shown

References

- [1] Brandl MT. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*. 2006;44:367-392.
- [2] Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72:3284-3290.
- [3] Tyler HL, Triplett EW. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2008;46:53-63.
- [4] Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;104:613-626.
- [5] Tauxe RV. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*. 1997;3:425-434.
- [6] Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*. 2004;67:2342-2353.
- [7] De la Cruz F, Davies J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*. 2000;8:128-133.
- [8] Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in Bacteria. *American Journal of Infection Control*. 2006; 34 (Suppl. 1):3-10.
- [9] Heuer H, Smalla K. Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety*. 2007;6:3-13.
- [10] McManus PS, Stockwell VO, Sudin GW, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*. 2002;40:443-465.
- [11] Lipsitch M, Singer RA, Levin BR. Antibiotics in agriculture: when is it time to close the door? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2002;99:5752-5754.
- [12] Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silvergeld EK, Morris JG. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2002;99:6434-6439.
- [13] Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(Suppl. 3):107-110.

- [14] Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2004;48:522-531.
- [15] Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53:28-52.
- [16] Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*. 2006;65:725-759.
- [17] Blanco G, Lemus JA, Grande J. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environmental Research*. 2009;109:405-412.
- [18] Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2008;6:733-750.
- [19] Walsh C, Fanning S. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens: a cause of concern? *Current Drugs Targets* 2008;9:808-815.
- [20] Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966; 445:493-496.
- [21] Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;33(Suppl. 3) 108-115.

3.3. PUBLICACIÓ 2

Falomir MP, Gozalbo D and Rico H (2010). Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. In: “*Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*” (Ed. A. Mendez Vilas). Formatex Research Center (Badajoz, Spain), Vol. 2, pp. 1175-1181.

ISBN: 978-84-614-6195-0

Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers

M.P. Falomir, D. Gozalbo and H. Rico

Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain

Fresh vegetables normally carry natural non-pathogenic epiphytic microorganisms, but during growth, harvest, transportation and further handling the produce can be contaminated with pathogens from animal and human sources. As most of these produce are eaten without further processing, their microbial content may represent a risk factor for the consumer's health and therefore a food safety problem. The consumption of fresh vegetables has been increasing in recent years, and since the early 1990s the reported outbreaks associated with consumption of fresh vegetables have grown steadily. Most of the reported outbreaks of gastrointestinal disease linked to the fresh produce have been associated with bacterial contamination, particularly with members of the *Enterobacteriaceae* family. In addition, the presence of antibiotic resistances both in epiphytic and pathogenic microorganisms in fresh vegetables may contribute to horizontal spreading of resistances among bacterial populations. In this study we have determined the presence of coliform bacteria as well as their antibiotic susceptibilities in fresh vegetables, as an indicator of their microbiological quality and their potential as a risk factor for consumer's health. Samples of several fresh vegetables (n: 116) (i) collected directly from cultivated lands, (ii) from supermarkets and greengrocer's shops in Valencia city (Spain) (including samples of ready-to-eat four range vegetables), (iii) as well as ready-to-eat salads (n: 16) served in dining halls of a nursery and a primary school (including fresh vegetables used as ingredients to prepare the salads) were analyzed. Coliforms and other enterobacterial species were isolated in a significant proportion of individual vegetable samples (average >50%), whereas this proportion increased in ready-to-eat salads (100%); the identified isolates included mainly species belonging to *Klebsiella*, *Enterobacter*, and other genera (*Serratia*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Flavimonas*, *Hafnia*, and others), as well as four identified as *Escherichia coli*. Susceptibility of isolates to eleven common chemotherapeutic agents was tested. Most isolates were resistant to ampicillin, and to amoxicillin/clavulanic acid; although resistances to other chemotherapeutic agents were rare, some isolates showed multiresistance to 3-5 agents. Therefore, microbial contamination of fresh vegetables with opportunistic pathogens can be considered as a food safety concern, as consumption of these produce may represent a potential risk for the consumer's health, particularly in debilitated or immunocompromised individuals. Since bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as the human colon, the presence of antibiotic-resistant bacteria in fresh vegetables may constitute an additional food safety concern.

Keywords coliform bacteria; fresh vegetables; antibiotic resistance

1. Introduction

During the last years, the consumption of fresh vegetables has been increasing as consumers strive to eat healthy diets and the availability of these produce, up till recently considered as seasonal, has been extended over the whole year [1,2]. In addition, the consumption of "four range" vegetables, a term that refers to packaged, cleaned, possibly chopped and mixed vegetables ready to be seasoned and eaten, have gained popularity among consumers. Fresh vegetables normally carry natural non-pathogenic epiphytic microorganisms, but during growth, harvest, transportation and further handling the produce can be contaminated with pathogens from animal and human sources. As most of these produce are eaten without further processing, their microbial content may represent a risk factor for the consumer's health and therefore a food safety problem [3-5]. Contamination can arise as a consequence of treating soil with organic fertilisers, such as sewage sludge and manure, and from the irrigation water, as well as from the ability of pathogens to persist and proliferate in vegetables [4,6]. The epidemiology of foodborne disease has changed rapidly over the last decades as, shortly after some major human pathogens were recognized to be spread from animal reservoirs, fresh vegetables have emerged as new vehicles for the transmission of these infectious diseases. Since the early 1990s, awareness of the potential of fresh produce to cause foodborne disease has increased, and reported outbreaks associated with consumption of fresh vegetables have grown steadily. Most of the reported outbreaks of gastrointestinal disease linked to the fresh produce have been associated with bacterial contamination, particularly with members of the *Enterobacteriaceae* family [4,5,7-9].

In addition, the presence of antibiotic resistances both in normal flora and pathogenic microorganisms in fresh vegetables may contribute to horizontal spreading of resistances between different isolates, species and genera. The presence of resistance genes on transferable elements facilitates distribution of resistance and the widespread use of antibiotics allows direct selection or co-selection of resistances [10,12]. Hospitals and commercial animal husbandry are prime areas of antibiotic resistance development. The use of large amounts of antibiotics in plant agriculture could lead to a selection of resistant bacteria; applying manure from animal farming to agricultural fields or the use of contaminated water for irrigation could also spread resistant bacteria to plants [13-20]. Bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as vegetal

surfaces or human colon. Therefore, the presence of antibiotic-resistant bacteria in fresh vegetables constitutes an additional concern for consumer safety [21-22].

In this work we have determined the presence of coliform bacteria, as well as their antibiotic susceptibilities, in fresh vegetables as an indicator of their microbiological quality and their potential as a risk factor for consumers. Samples from cultivated lands, supermarkets and greengrocer's shops in Valencia city (Spain) (including samples of ready-to-eat four range vegetables), as well as ready-to-eat salads served in dining halls of two Valencia schools (a nursery and a primary school) were analyzed.

2. Materials and Methods

2.1 Vegetables

Ten samples from six different fresh vegetables (two kinds of tomato, three of lettuce, and one of carrot) purchased from supermarkets and from retail greengrocer's shops in Valencia city (Spain) were studied. Some samples (spinach and lettuce) were directly collected from cultivated lands. Fresh vegetables from the kitchen of a nursery (lettuce, rucola/arugula, lamb's lettuce, cucumber and tomato; n: 8) and a primary school (tomato and lettuce; n: 8) in Valencia city were also analyzed; some of these vegetables were from four range products (lettuce, rucola/arugula and lamb's lettuce). Ready-to-eat salads (n: 16) served in the dining halls of the nursery (preschool) and the primary school were also analyzed. Finally, our study also included a variety of four range vegetables purchased from supermarkets in Valencia city.

2.2 Microbiological methods

Selected samples of each vegetable (2-5 g) were added with nine volumes of Tryptone water (MicroKit, Valdemorillo, Spain) (1/10 dilution) and homogenised in a Classic Masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain). Samples from salads (4-8 g), containing all fresh vegetable produce used as ingredients for their preparation, were processed identically; these salads were handled by the staff of the nursery and the primary school respectively, according to their usual protocols. The most probable number of coliforms (MPN) was determined according to standard methods: 1 ml of serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , in Tryptone water) of the homogenates were inoculated by triplicate in Brilliant Green Bile 2% Lactose Broth (BGBLB) (MicroKit, Valdemorillo, Spain). After incubation for 24-28 h at 37 °C the number of positive cultures (determined by turbidity and gas production) were used to determine the MPN/g. Positive cultures were plated on selective media (EMB Levine agar, Liofilchem, Roseto, Italy) to isolate single colonies, which were identified by correlating colonial appearance, Gram stain, oxidase reaction, and biochemical reactions using the BBL Crystal E/NF identification system (Becton Dickinson, Loveton Circle Spark, MA, USA).

Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion [23] according to standard microbiological procedures. Briefly, bacterial suspensions (0.5 turbidity, McFarland Standard, BioMérieux, Madrid, Spain) were plated on Mueller-Hinton agar (Liofilchem, Roseto, Italy), and after addition of antibiotic-containing disks, plates were incubated for 24 h at 37°C. Diameters of the growth inhibition halos were used to determine the clinical resistance/susceptibility to the antibiotics. Disks of eleven antibacterial chemotherapeutic agents (most of them antibiotics) were used in this study (Liofilchem, Roseto, Italy): amoxicillin/clavulanic acid (Augmentine) 30 µg, ampicillin 10 µg, cefotaxime 30 µg, ceftazidime 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, chloramphenicol 30µg, co-trimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) 25 µg, streptomycin 10µg, gentamicin 10 µg, nitrofurantoin 300 µg, and tetracycline 30 µg.

3. Results and Discussion

3.1 Coliform bacteria in fresh vegetables, four range produce and ready-to-eat salads

First, ten samples of the six selected fresh vegetables were tested for the presence of coliform bacteria. The term coliform bacteria refers to Gram-negative bacilli that grow in the presence of bile and ferment lactose with production of gas, although the methodology used also allows the detection of non-coliform species belonging to the *Enterobacteriaceae* family as well as some non-enterobacteria Gram-negative species, since mixed bacterial populations are found in vegetables and therefore non-coliform species present in positive cultures in BGBLB tubes are then isolated on EMB-agar plates. In our study all colonies isolated on EMB plates were identified.

Coliforms were isolated in 50% out of the 60 samples analyzed, although only one isolate was identified as *Escherichia coli* (Table 1). The identified species (n: 45) included enterobacteria: *Klebsiella pneumoniae* (n: 5), *Klebsiella oxytoca* (n: 10), *Serratia marcescens* (n: 1), *Serratia rubidaea* (n: 1), *Enterobacter cloacae* (n: 20), *Kluyvera ascorbata* (n: 2), and *Pantoea agglomerans* (n: 3), as well as other bacterial species: *Acinetobacter baumannii* (n: 1) and *Stenotrophomonas maltophilia* (n: 1). As shown in Table 1, in some cases (12 out of 60) the bacterial burden

(NMP) of the samples was over the detection limit of the method (>2400 coliforms/g), whereas in 50% of samples the presence of coliform bacteria was under the detection limit (<3 coliforms/g). Carrots were the vegetables more contaminated, followed by the three types of lettuce, whereas both types of tomatoes showed minor content of bacterial burden; these results correlate with the probability of the analysed vegetables to be in contact with the source of contamination during growth: soil, organic fertilisers and irrigation water [3-6]. It should be noted that in the area of Valencia, and in general in the Spanish Mediterranean coast, the use of manure as a fertilizer is a common practice. In addition, vegetables from supermarkets were less contaminated with coliform bacteria (11 samples out of 30) as compared to vegetables from retail greengrocer's shops (19 samples out of 30). Besides, previous standard washing of vegetables with water did not significantly affect the results obtained (not shown) indicating that coliform bacteria possess mechanisms for attachment to vegetal surfaces [3,5,6]. Preliminary results showed the presence of species of *Enterobacteriaceae* (*Pantoea agglomerans*, *Escherichia vulneri*, and others) in vegetable samples collected directly from the farm land (lettuce and spinach) (not shown).

Table 1 Bacterial species isolated from fresh vegetables purchased from supermarkets and from retail greengrocer's shops.

Sample (n: 10)	MPN ^(1,2)	Bacterial species ⁽²⁾
Tomato (round)	>2400 (1/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1/10)
	9-43 (1/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/10)
	<3 (8/10)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/10)
Tomato (pear)	>2400 (1/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2/10)
	4-480 (3/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/10)
	<3 (6/10)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/10)
		<i>Kluyvera ascorbata</i> (1/10)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (1/10) <i>Serratia rubidaea</i> (1/10)
Carrot	>2400 (5/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (7/10)
	23-1100 (4/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (5/10)
	>3 (1/10)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2/10)
		<i>Kluyvera ascorbata</i> (1/10) <i>Serratia marcescens</i> (1/10)
Lettuce hearts	>2400 (3/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (4/10)
	23-480 (2/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2/10)
	<3 (5/10)	
Lettuce (romaine)	>2400 (2/10)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (1/10)
	4-480 (2/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2/10)
	<3 (6/10)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/10)
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/10) <i>Pantoea agglomerans</i> (1/10)
Lettuce (iceberg)		
	4-480 (6/10)	<i>Enterobacter cloacae</i> (4/10)
	<3 (4/10)	<i>Escherichia coli</i> (1/10)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (1/10) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1/10)

⁽¹⁾ MPN: most probable number of coliforms/g.

⁽²⁾ The frequency of either the MPN or the bacterial species isolated is indicated in parenthesis.

To go further in our study we decided to determine the presence of coliforms in ready-to-eat salads served in the dining halls of a nursery (preschool) and a primary school in Valencia city. The study included both the served salads and the fresh vegetables used as ingredients for their preparation. Some of these ingredients were from four range vegetable products (lettuce, rucola/arugula and lamb's lettuce). Results were similar in salads from both dining halls (Table 2 and Table 3): bacterial presence was detected in all samples (100%, n: 16). The species more frequently isolated were *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella oxytoca*, although other species were also detected (*Enterobacter cancerogenus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Kluyvera ascorbata* and *Enterobacter sakazakii*). In some cases (3 out of 16) the NMP was over 2400 coliforms/g. Accordingly, bacterial contamination was also detected (an average

of 57%, 32 out of 56 samples) in most of the individual vegetables used as ingredients for the salads (Tables 2 and 3), with seven samples containing a fungal burden over the detection limit (>2400 coliforms/g). The most contaminated samples were iceberg lettuce and rucola, whereas tomato, lamb's lettuce and cucumber were much less contaminated. Interestingly some bacterial species (*Hafnia alvei*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Serratia marcescens*, and others) were detected in some ingredients but not in the final salad, and some bacterial species detected in the salad (*Enterobacter cancerogenus*, *Kluyvera ascorbata*, and others) were not found in the ingredients. These results suggest that (1) bacterial species are not uniformly distributed on the vegetal surfaces and/or some contamination of salads may occur during their preparation, and (2) the treatment of vegetables prior to salad preparation performed either in the nursery (washing with drinking water), or the primary school (washing with diluted lye) are not sufficient to eliminate significantly the bacterial burden of the vegetables. Interestingly, some of these samples were from four range vegetables (Table 2 and Table 3), and surprisingly, the four range iceberg lettuce samples contained more bacterial contamination than lettuces from supermarkets and from retail greengrocer's shops (Table 1), indicating that during processing of vegetables to prepare four range products either bacterial contamination is not significantly eliminated or even bacterial contamination may occur. These results agree with additional results which show the presence of enterobacterial species in a variety of four range vegetable products, particularly *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella* species (*K. oxytoca* and *K. pneumoniae*) among others (*Citrobacter freundii*, *Escherichia hermannii*, *Kluyvera ascorbata*, *Enterobacter sakazakii*, etc.) (Falomir *et al.*, unpublished results). Adhesion to vegetal surfaces and internalization of bacteria may limit the usefulness of conventional processing and sanitizing methods to treat fresh produce, and the effect of washing on the contaminated produce appears to be weak, thus indicating that prevention of contamination is paramount to control fresh-produce-associated outbreaks [2,24].

Table 2 Bacterial species isolated from fresh vegetables (ingredients) and salads of the day nursery.

Sample (n: 8)	MPN ^(1,2)	Bacterial species ⁽²⁾
Tomato (round)	43 (1/8) <3 (7/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1/8)
Lettuce (iceberg) (four range)	>2400 (2/8) 11-480 (6/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (6/8) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2/8) <i>Pantoea agglomerans</i> (1/8) <i>Flavimonas oryzihabitans</i> (2/8)
Rucola/arugula (four range)	>2400 (3/8) 43-480 (4/8) <3 (1/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (6/8) <i>Flavimonas oryzihabitans</i> (1/8) <i>Kluyvera ascorbata</i> (1/8) <i>Enterobacter sakazakii</i> (2/8)
Lamb's lettuce (four range)	4-240 (4/8) <3 (4/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2/8) <i>Enterobacter gergoviae</i> (1/8) <i>Serratia marcescens</i> (1/8)
Cucumber	4 (1/8) <3 (7/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2/8)
Salad	<2400 (2/8) 28-1100 (6/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (6/8) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/8) <i>Enterobacter cancerogenus</i> (1/8) <i>Enterobacter sakazakii</i> (1/8)

⁽¹⁾ MPN: most probable number of coliforms/g.

⁽²⁾ The frequency of either the MPN or the bacterial species isolated is indicated in parenthesis.

Despite the fact that no bacterial pathogens were identified in our study, such as *E. coli* O157:H7 (although the four isolates identified as *E. coli* were not further characterized), *Salmonella* and *Shigella*, the presence in vegetables that are eaten raw of some opportunistic bacterial pathogens, either as epiphytic flora or as a result of contamination from soil, animal or human sources (*Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Acinetobacter baumannii*, and others) points out that fresh vegetables may represent a risk factor for infection [1-4] in the growing immunocompromised population, and therefore consumption of raw vegetables should be considered as a potential food safety concern in particular populations subsets.

Table 3 Bacterial species isolated from fresh vegetables (ingredients) and salads of the primary school.

Sample (n: 8)	MPN ^(1,2)	Bacterial species ⁽²⁾
Tomato (round)	9-1100 (4/8) <3 (4/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1/8) <i>Klesiella oxytoca</i> (1/8) <i>Escherichia coli</i> (1/8) <i>Pantoea agglomerans</i> (1/8)
Lettuce (iceberg) (four range)	>2400 (2/8) 23-1100 (5/8) <3 (1/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2/8) <i>Enterobacter aerogenes</i> (1/8) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2/8) <i>Hafnia alvei</i> (2/8) <i>Citrobacter freundii</i> (1/8) <i>Escherichia coli</i> (1/8)
Salad	>2400 (1/8) 4-240 (7/8)	<i>Enterobacter cloacae</i> (4/8) <i>Enterobacter cancerogenus</i> (1/8) <i>Klebsiella oxytoca</i> (3/8) <i>Citrobacter freundii</i> (1/8) <i>Kluyvera ascorbata</i> (1/8) <i>Escherichia coli</i> (1/8)

⁽¹⁾ MPN: most probable number of coliforms/g.

⁽²⁾ The frequency of either the MPN or the bacterial species isolated is indicated in parenthesis.

3.2 Resistance patterns

Antibiotic-resistant bacteria or their corresponding resistance determinants are known to spread from animals to humans via the food chain [17,25]. Fresh vegetables that are eaten raw may contribute to this phenomenon, as epiphytic bacteria may develop antibiotic resistances as a consequence of the large amount of antibiotics used in agriculture, and also treating soil with organic fertilisers, such as sewage sludge and manure, and contaminated irrigation water, may lead to vegetal contamination with resistant bacteria from animal and/or human sources [10-17]. Therefore, we determined the presence of resistances to eleven common antibacterial chemotherapeutic agents in all bacterial strains (n: 106) isolated from fresh vegetables from supermarkets and from retail greengrocer's shops, as well as from ingredients of salads (including four range vegetables) and served salads (Table 4) of the nursery and the primary school. Most isolates were resistant to ampicillin (83 isolates), and to amoxicillin/clavulanic acid (86 isolates). Resistances to other agents were rare: tetracycline (seven resistant isolates out of 106), nitrofurantoin (14 resistant isolates), co-trimoxazole (two resistant isolates), streptomycin (three resistant isolates), cefotaxime (three resistant isolates), chloramphenicol (two resistant isolates) and ceftazidime (one resistant isolate). No resistances were found to gentamicin and ciprofloxacin. Only eight bacterial isolates (two *P. agglomerans*, one of *S. maltophilia*, two *E. cloacae*, one *E. gergoviae*, one *E. coli*, and one *K. oxytoca*) were susceptible to all antibiotics tested, whereas ten isolates (eight *E. cloacae*, one *S. rubidaea*, and one *F. oryzihabitans*) were resistant to three antibiotics, another six isolates (*A. baumannii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, and *F. oryzihabitans*) showed multiresistance to four agents, and two isolates (*E. cloacae*) were resistant to five antibiotics (Table 4).

As above mentioned, the bacterial isolates from fresh vegetables include several opportunistic human pathogens, which may cause a variety of infectious diseases in the immunocompromised host and, in addition, antibiotic resistances can be horizontally disseminated, after ingestion by the consumer, to other gut commensal or pathogenic bacteria. On the other hand, these produce may represent an additional source of bacterial food contamination during handling at home. Therefore, consumption of fresh vegetables may represent a potential risk factor for the consumer health, particularly in debilitated or immunocompromised individuals, and microbial contamination of these produce can be considered as a food safety concern; for this reason, the hygienic quality of fresh vegetables should be improved and controlled to minimize the foodborne disease risk, and better methods of preventing contamination on the farm, or during packing or processing, as well as the use of a terminal control such as irradiation could reduce the risk of disease transmission from fresh produce [2,4,5,7-9,21,22].

Table 4 Resistance patterns of the bacterial species isolated from ingredients (including four range vegetables) and salads of the nursery (preschool) and the primary school.

Species ⁽¹⁾	Resistances ⁽²⁾
<i>A. baumannii</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Chloramphenicol, Nitrofurantoin
<i>C. freundii</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>C. freundii</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Cefotaxime, Ceftazidime
<i>E. aerogenes</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin,
<i>E. cancerogenus</i> (2)	Amoxicillin/clavulanic
<i>E. cloacae</i> (3)	Amoxicillin/clavulanic
<i>E. cloacae</i> (34)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Cefotaxime, Nitrofurantoin, Co-trimoxazole
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Co-trimoxazole, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (6)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Nitrofurantoin
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Nitrofurantoin, Streptomycin, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin, Nitrofurantoin, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (2)	None
<i>E. gergoviae</i> (1)	None
<i>E. sazakii</i> (3)	Amoxicillin/clavulanic
<i>E. coli</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic
<i>E. coli</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>E. coli</i> (1)	Ampicillin
<i>E. coli</i> (1)	None
<i>F. oryzihabitans</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic
<i>F. oryzihabitans</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Chloramphenicol, Nitrofurantoin
<i>F. oryzihabitans</i> (1)	Ampicillin, Amoxicillin/clavulanic, Cefotaxime, Nitrofurantoin
<i>H. alvei</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic
<i>H. alvei</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>Kb. oxytoca</i> (10)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>Kb. oxytoca</i> (4)	Ampicillin
<i>Kb. oxytoca</i> (1)	None
<i>Kb. pneumoniae</i> (2)	Ampicillin
<i>Kb. pneumoniae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic
<i>Kb. pneumoniae</i> (5)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>Kb. pneumoniae</i> (1)	Ampicillin, Nitrofurantoin, Tetracycline, Streptomycin
<i>Kv. ascorbata</i> (2)	Amoxicillin/clavulanic
<i>Kv. ascorbata</i> (2)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>P. agglomerans</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic
<i>P. agglomerans</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>P. agglomerans</i> (1)	Ampicillin
<i>P. agglomerans</i> (2)	None
<i>S. marcescens</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic
<i>S. marcescens</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Nitrofurantoin, Tetracycline
<i>S. rubidaea</i> (1)	Ampicillin, Streptomycin, Tetracycline
<i>S. maltophilia</i> (1)	(None)

⁽¹⁾ Number of isolates is indicated in parenthesis

⁽²⁾ Only resistances to the eleven chemotherapeutic agents assayed are shown

It should be stressed that antibiotics are used in animal livestock production both for growth promotion and improvement of feed efficiency as well as for therapeutic treatment of disease. Antibiotic resistance selection occurs among gastrointestinal bacteria, which are also excreted, along with antibiotics that are not absorbed by animals, in manure and waste holding systems. Therefore, land application of animal waste, a common disposal method used in Spain and other countries, including United States, is a means for environmental entry of both antibiotics and genetic resistance determinants [26]. Therefore, issues concerning environmental contamination and transmission of antimicrobial-resistant bacteria through livestock manure should be fully addressed, and there is the need to improve environmental regulations regarding manure management practice [27].

References

- [1] Pollack S. Consumer demand for fruit and vegetables: the U.S. example. In: Regmi A, ed. *Changing Structure of Global Food Consumption and Trade*. Washington, DC: Economic Research Service/United States Department of Agriculture. 2001: publication n°. WRS01-1, pp. 49-54.
- [2] Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*. 2009; 137:307-315.
- [3] Brandl MT. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*. 2006; 44:367-392.
- [4] Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72:3284-3290.
- [5] Tyler HL, Triplett EW. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2008; 46:53-63.
- [6] Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 104:613-626.
- [7] Tauxe RV. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*. 1997;3:425-434.
- [8] Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*. 2004; 67:2342-2353.
- [9] DuPont HL. The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 45:1353-1361.
- [10] De la Cruz F, Davies J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*. 2000; 8:128-133.
- [11] Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in Bacteria. *American Journal of Infection Control*. 2006; 34 (Suppl. 1):3-10.
- [12] Heuer H, Smalla K. Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety*. 2007; 6:3-13.
- [13] McManus PS, Stockwell VO, Sudin GW, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*. 2002;40: 443-465.
- [14] Lipsitch M, Singer RA, Levin BR. Antibiotics in agriculture: when is it time to close the door? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2002; 99:5752-5754.
- [15] Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silvergeld EK, Morris JG. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2002; 99:6434-6439.
- [16] Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(Suppl. 3):107-110.
- [17] Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2004; 48:522-531.
- [18] Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 53:28-52.
- [19] Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*. 2006; 65:725-759.
- [20] Blanco G, Lemus JA, Grande J. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed choughs. *Environmental Research*. 2009; 109:405-412.
- [21] Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2008; 6:733-750.
- [22] Walsh C, Fanning S. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens: a cause of concern? *Current Drugs Targets* 2008; 9:808-815.
- [23] Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966; 45:493-496.
- [24] Burnett SL, Beuchat LR. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Ecology*. 2001; 27:104-110.
- [25] Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33(Suppl. 3):108-115.
- [26] Chee-Sandorf LC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*. 2009; 38:1086-10108.
- [27] Venglovsky J, Sasakova N, Placha I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*. 2009;100:5386-5391.

3.4. PUBLICACIÓ 3

Rico H, Gozalbo D, Sebastiá C and **Falomir MP** (2012). *Enterobacter cloacae* in fresh vegetables: A potential carrier of antibiotic resistances to consumers. *Food Studies: An Interdisciplinary Journal*, 2: 1-8.

ISSN: 2160-1933

***Enterobacter cloacae* in Fresh Vegetables: A Potential Carrier of Antibiotic Resistances to Consumers**

Hortensia Rico, University of Valencia, Spain
Daniel Gozalbo, University of Valencia, Spain
Carlos Sebastián, University of Valencia, Spain
María Pilar Falomir, University of Valencia, Spain

Abstract: Facultative pathogenic enterobacteria are commonly found in water, soil and vegetables, and Enterobacter is the most common genera isolated from vegetable samples, particularly E. cloacae. The aim of this work was to determine the prevalence, and clinical resistances to antibiotics, of E. cloacae in different fresh vegetables as an indicator of their potential risk to serve as a carrier of clinical resistances to consumers. A total of 160 samples of fresh vegetables (lettuce, rucola, lamb's lettuce, cucumber, tomato, carrot, spinach) collected from markets in Valencia city (Spain) were analyzed by standard microbiological methods. A total of 59 isolates were obtained (37% positive samples). Only four isolates were susceptible to all agents tested. Most isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic (51 isolates) or to ampicillin (52). Other resistances were less frequent: 11 isolates were resistant to nitrofurantoin, 5 isolates were resistant to tetracycline, 3 resistances to co-trimoxazol were found, as well as one resistance to cefotaxime and another one to streptomycin. Most isolates showed clinical resistance to several agents: resistance to two agents (amoxicillin/clavulanic and ampicillin) was found in 48 isolates; 10 isolates were resistant to 3 agents: amoxicillin/clavulanic, ampicillin and tetracycline (2 isolates), amoxicillin/clavulanic, ampicillin and nitrofurantoin (6 isolates), ampicillin, co-trimoxazole and nitrofurantoin (1 isolate) and ampicillin, nitrofurantoin and tetracycline (1 isolate); one isolate showed multiresistance to four chemotherapeutic agents (amoxicillin/clavulanic, ampicillin, co-trimoxazol and tetracycline), and two isolates were resistant to five chemotherapeutic agents: amoxicillin/clavulanic, ampicillin, cefotaxime, nitrofurantoin and co-trimoxazol (one isolate), and amoxicillin/clavulanic, ampicillin, nitrofurantoin, streptomycin and tetracycline (one isolate). No resistances to ceftazidime, ciprofloxacin, and chloramphenicol were detected. These results support that E. cloacae may serve as an indicator of bacterial contamination of these fresh produce, and therefore of the potential risk for consumer health, and suggest a role for this species as a carrier of resistance determinants from farms to consumers, which may constitute an additional food safety concern.

Keywords: Fresh Vegetables, Enterobacter cloacae, Antibiotic Resistance

Introduction

Availability of fresh vegetables, up till recently considered as seasonal, has been extended over the whole year, and consumption of these produce has been increasing during the last years as ingredients of healthy diets. Fresh vegetables normally carry natural non-pathogenic epiphytic microorganisms, but during growth, harvest, transportation and further handling the produce can be contaminated with pathogens from animal and human sources. Considering that these produce are often eaten raw, their microbial content can be a significant risk factor for the consumer health. Foodborne outbreaks associated with consumption of fresh vegetables have been increasing steadily during last decades (Lynch, Tauxe and Hedberg 2009; Tyler and Triplett 2008). Most of the reported outbreaks of gastrointestinal disease linked to the fresh produce have been associated with bacterial contamination, particularly with members of the *Enterobacteriaceae* family (Brandl 2006; DuPont 2007; Heaton and Jones 2008). We have previously shown the presence, at relatively high frequency, of some opportunistic bacterial pathogens, mostly belonging to the *Enterobacteriaceae* family, in vegetables that are eaten raw, pointing out that fresh vegetables may represent a risk factor of infection for the growing immunocompromised population, and therefore these produce should be considered as a

potential food safety concern in particular population subsets (Falomir, Gozalbo and Rico 2010, Falomir *et al.* 2010).

There is an additional food safety concern related to the bacterial content in fresh vegetables, as the presence of antibiotic resistances both in epiphytic and pathogenic microorganisms in fresh vegetables may contribute to horizontal spreading of resistances among bacterial populations, indicating that fresh produce may play a role as a carrier and reservoir of antibiotic resistant bacteria (Falomir, Gozalbo and Rico 2010; Schwaiger *et al.* 2011a). Resistance to antimicrobial agents in clinically relevant Gram-negative bacteria is an increasingly important problem which in the last years has spread from hospital setting to the community (Martínez-Martínez and Calvo 2010). Although hospitals and commercial animal husbandry are the prime areas for development of antibiotic resistances, the use of large amounts of antibiotics in plant agriculture has also contributed to a selection of resistant bacteria in plants, together with the use of manure from animal farming to agricultural fields or the use of contaminated water for irrigation (Boehme *et al.* 2004; Lipsitch, Singer and Levin 2002; McManus *et al.* 2002; Phillips *et al.* 2004; Sarmah, Meyer and Boxall 2004; Vidaver 2002; Walsh and Fanning 2008). Therefore, bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have a great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as vegetal surfaces or human colon, particularly considering that the intestine is a hot spot for horizontal gene transfer among microbes (Aminov 2011; Kurokawa *et al.* 2007).

Coliform bacteria are commonly found in the intestinal tract of mammals and birds and therefore are indicators of faecal contamination. Numerous facultative pathogenic enterobacteria, as *Enterobacter*, are also commonly found in water, soil and vegetables. In addition, *Enterobacter* is the most common genera of the *Enterobacteriaceae* family isolated from vegetable samples, particularly *E. cloacae* (Falomir, Gozalbo and Rico 2010; Falomir *et al.* 2010; Schwaiger *et al.* 2011b). The aim of this work was to determine the prevalence and antibiotic resistances of *E. cloacae* in different fresh vegetables collected from various sources, as an indicator of their potential risk to serve as a carrier of clinical resistances from farms to consumers.

Materials and Methods

A total of 160 samples of fresh vegetables (several types of lettuce, rucola, lamb's lettuce, cucumber, tomato, carrot, spinach) were analyzed. Samples were collected from supermarkets, greengrocer's shops (n: 60), the kitchen of two schools (n: 70, including ready-to-eat salads, n: 20) in Valencia city and directly from farms (n: 10). Selected samples of each vegetable (2-5 g) were mixed with nine volumes of Tryptone water (MicroKit, Valdemorillo, Spain) and homogenized in a Classic Masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain), as previously described (Falomir, Gozalbo and Rico 2010, Falomir *et al.* 2010). Samples from salads (4-8 g), containing all ingredients used for their preparation, were processed identically. Homogenates of the samples were inoculated in Brilliant Green Bile 2% Lactose Broth (BGBLB) and cultured at 37°C 24-28 h. Positive cultures in BGBLB were plated on selective media (EMB Levine agar) for Gram-negative bacteria to isolate single colonies, and *E. cloacae* isolates were identified by biochemical tests using the BBL Crystal E/NF identification system (Becton Dickinson, Loveton Circle Spark, MA, USA). All isolates were identified with a confidence >0.95. Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion according to standard microbiological procedures (Kronvall and Ringertz 1991). Disks of eleven antibacterial chemotherapeutic agents (most of them antibiotics) were used in this study (Liofilchem, Roseto, Italy): amoxicillin/clavulanic acid 30 µg, ampicillin 10 µg, cefotaxime 30 µg, ceftazidime 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, chloramphenicol 30µg, co-trimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) 25 µg, streptomycin 10µg, gentamicin 10 µg, nitrofurantoin 300 µg, and tetracycline 30 µg. Clinical resistances to

chemotherapeutic agents were deduced from the diameter of the growth inhibition areas, according to the known diameters for susceptibility and resistance.

Results and Discussion

A total of 59 *E. cloacae* isolates were obtained (37% positive samples) (Table 1). Samples from markets were 33% positive for *E. cloacae* (20 out of 60), vegetables from schools were 34% positive (24 out of 70), whereas samples collected directly from farms were 30% positive (3 out of 10). *E. cloacae* was detected in all vegetables species studied: 70% in carrot samples (n: 10), 15% in tomato (n: 40), 35% in lettuce (n: 54, including lettuce hearts and four range samples), 70% in rucola (n: 10), 30% in lamb's lettuce (n: 10), 20% in cucumber (n: 10), whereas two spinach samples were free of *E. cloacae*. Similarly, samples of prepared salads ready to eat were 60% positives (12 out of 20) for *E. cloacae*. Interestingly, the prevalence of *E. cloacae* in four range vegetables (47%, 19 out of 40) was not diminished, but even increased, compared with all other samples of fresh vegetables (28%, 28 out of 100). These results indicate that *E. cloacae* is an usual bacteria in fresh vegetables and that during processing of vegetables to prepare ready-to-eat four range products bacterial contamination is not significantly diminished but even an increase is detected; this observation agrees with previous results indicating that the standard washing of vegetal samples with water prior to the microbiological analysis did not significantly improve their content in enterobacteria, indicating that these bacterial species possess mechanisms for attachment to vegetal surfaces. Bacterial ability to adhere to surface of vegetables and/or internalization of bacteria within vegetal tissues (Brandl 2006, Heaton and Jones 2008; Tyler and Triplett 2008) probably limits the usefulness of conventional processing and sanitizing methods to treat fresh vegetables, thus indicating that prevention of contamination is very important to control outbreaks associated with the consumption of fresh produce. It should be indicated that in the Spanish Mediterranean coast, including the area of Valencia, the use of manure as a fertilizer is a quite common practice that may contribute to bacterial contamination of soil, water and therefore of vegetables.

Table 1. *E. cloacae* isolates from fresh produce purchased from markets (including four range vegetables and ready to eat salads from schools) and some samples from farms.

Sample (n)	Number of isolates (ratio of positive samples)	
Tomato (n: 40)	6 <i>E. cloacae</i> isolates	(6/40)
Carrot (n: 10)	7 <i>E. cloacae</i> isolates	(7/10)
Lettuce romaine (n: 10)	2 <i>E. cloacae</i> isolates	(2/10)
Lettuce iceberg (n: 10)	4 <i>E. cloacae</i> isolates	(4/10)
Lettuce hearts (n: 10)	4 <i>E. cloacae</i> isolates	(4/10)
Cucumber (n: 10)	2 <i>E. cloacae</i> isolates	(2/10)
Lettuce iceberg (n: 20, four range)	9 <i>E. cloacae</i> isolates	(9/20)
Lamb's lettuce (n: 10, four range)	3 <i>E. cloacae</i> isolates	(3/10)
Rucola (n: 10, four range)	7 <i>E. cloacae</i> isolates	(7/10)
Ready to eat salads (n: 20)	12 <i>E. cloacae</i> isolates	(12/20)
Tomato (n: 4, farm)	1 <i>E. cloacae</i> isolates	(1/4)
Lettuce romaine (n: 4, farm)	2 <i>E. cloacae</i> isolates	(2/4)
Spinach (n: 2, farm)	None	
TOTAL (n: 160)	59 <i>E. cloacae</i> isolates	(59/160)

Clinical resistance of all 59 *E. cloacae* isolates to eleven common antibacterial chemotherapeutic agents was tested (Table 2). Only four isolates were susceptible to all agents

tested. Most isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic (51 isolates) or to ampicillin (52). Resistances to other chemotherapeutic agents were less frequent: 11 isolates were resistant to nitrofurantoin, 5 isolates were resistant to tetracycline, 3 resistances to co-trimoxazole were found, as well as one resistant isolate to cefotaxime and another one to streptomycin. Interestingly, most isolates showed clinical resistance to several agents: resistance to two agents (amoxicillin/clavulanic and ampicillin) was found in 48 isolates, and one isolate was resistant to ampicillin and nitrofurantoin; 10 isolates were resistant to 3 agents: amoxicillin/clavulanic, ampicillin and tetracycline (2 isolates), amoxicillin/clavulanic, ampicillin and nitrofurantoin (6 isolates), ampicillin, co-trimoxazole, nitrofurantoin (1 isolate), and ampicillin, nitrofurantoin and tetracycline (1 isolate); one isolate showed multiresistance to four chemotherapeutic agents (amoxicillin/clavulanic, ampicillin, co-trimoxazole and tetracycline), and two isolates were resistant to five chemotherapeutic agents: amoxicillin/clavulanic, ampicillin, cefotaxime, nitrofurantoin and co-trimoxazole (one isolate), and amoxicillin/clavulanic, ampicillin, nitrofurantoin, streptomycin and tetracycline (one isolate). No resistances to ceftazidime, ciprofloxacin, and chloramphenicol were detected. Intermediate clinical resistances were not considered in this study. It should be noted that most isolates were resistant to extensively used antibiotics, such as the beta-lactams amoxicillin/clavulanic and ampicillin, whereas resistances to third generation cephalosporines, such as cefotaxime and ceftazidime, which have been used in a much more controlled way, are infrequent. As mentioned above, antibiotics are widely used in agriculture and in animal livestock production, leading to selection of resistant bacteria, particularly in the gastrointestinal tract of animals; both resistant bacteria and non absorbed antibiotics are excreted by animals in manure and waste holding systems. Therefore, application of animal waste, a common disposal method used in Spain and other countries, including United States, or the use of contaminated irrigation water, are means for environmental entry of both antibiotics and genetic resistance determinants to soil and plants; this points out that issues concerning environmental contamination and transmission of antibiotic-resistant bacteria through livestock manure should be fully addressed and that there is a need to improve environmental regulation concerning manure management practice (Chee-Sanford *et al.* 2009; Venglovsky, Sasakova and Placha 2009)].

Table 2 Resistance patterns of the *E. cloacae* isolates from fresh produce. Only resistances to the eleven chemotherapeutic agents tested are shown; intermediate resistances are not considered.

Isolate/number	Resistances
<i>E. cloacae</i> (4)	(None)
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin
<i>E. cloacae</i> (3)	Amoxicillin/clavulanic
<i>E. cloacae</i> (37)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin, Nitrofurantoin
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin, Nitrofurantoin, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin, Co-trimoxazole, Nitrofurantoin
<i>E. cloacae</i> (2)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (6)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Nitrofurantoin
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Co-trimoxazole, Tetracycline
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Cefotaxime, Nitrofurantoin, Co-trimoxazole
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic, Ampicillin, Nitrofurantoin, Streptomycin, Tetracycline

RICO ET. AL: ENTEROBACTER CLOACAE IN FRESH VEGETABLES

Our results support the notion that microbial contamination of fresh vegetables with opportunistic pathogens, such as *E. cloacae* and other species, can be considered as a food safety concern, particularly in debilitated or immunocompromised individuals, and besides, fresh produce can play a role as a carrier of antibiotic resistant bacteria from farm to consumer (Falomir, Gozalbo and Rico 2010; Falomir *et al.* 2010; Schwaiger *et al.* 2011a; Schwaiger *et al.* 2011b). Since bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as the human colon, the presence of antibiotic resistance determinants in *Enterobacteriaceae* species, such as *E. cloacae*, in fresh vegetables may constitute an additional food safety concern, specially taking into account that the intestine is a “hot spot” for horizontal gene transfer between microbes (Aminov 2011; Kurokawa *et al.* 2007). Therefore, as conclusions our work suggests that: (i) the relative high prevalence of *E. cloacae* in fresh vegetables (37%) supports that this species may serve as an indicator of bacterial contamination in these produce, and therefore of the potential risk for consumer health, and (ii) the presence of antibiotic resistances, particularly multiresistances that are found at high frequency in *E. cloacae* (24% of isolates are at least resistant to three out of 11 chemotherapeutic agents assayed), supports a role for this species as a carrier of resistance determinants from farm to consumers, probably contributing to the spreading of resistances to gut microbiota through horizontal gene transfer, therefore constituting an additional food safety concern.

REFERENCES

- Aminov, Rustam I. 2011. "Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota." *Frontiers in Microbiology* 2: 1-18
- Boehme, Sybille, Guido Werner, Ingo Klare, Rolf Reissbrodt, and Wolfgang Witte. 2004. "Occurrence of Antibiotic-Resistant Enterobacteria in Agricultural Foodstuffs." *Molecular Nutrition and Food Research* 48:522-531.
- Brandl, Maria T. 2006. "Fitness of Human Enteric Pathogens on Plants and Implications for Food Safety." *Annual Review of Phytopathology* 44:367-392.
- Chee-Sanford, Johanne C., Roderick I. Mackie, Satoshi Koike, Ivan G. Krapac, Yu-Feng Lin, Anthony C. Yannarell, Scott Maxwell, and Rustam I. Aminov. 2009. "Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes Following Land Application of Manure Waste". *Journal of Environmental Quality* 38:1086-10108.
- DuPont, Herbert L. 2007. "The Growing Threat of Foodborne Bacterial Enteropathogens of Animal Origin." *Clinical Infectious Diseases* 45: 1353-1361.
- Falomir, María P., Daniel Gozalbo, and Hortensia Rico. 2010. "Coliform Bacteria in Fresh Vegetables: from Cultivated Lands to Consumers." In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, edited by Antonio Mendez Vilas, vol.2, 1175-1181. Badajoz (Spain): Formatex Research Center.
- Falomir, María P., Daniel Gozalbo, Carlos Sebastián, and Hortensia Rico. 2010. "Detection and Antibiotic Susceptibility of Coliform Bacteria in Fresh Vegetables". In *Microorganisms in Industry and Environment. From Scientific and Industrial Research to Consumer Products*, edited by Antonio Mendez-Vilas, 372-376. Hackensack (NJ): World Scientific Publishing Co.
- Heaton, Joanna C., and Kevin Jones. 2008. "Microbial Contamination of Fruit and Vegetables and the Behaviour of Enteropathogens in the Phyllosphere: a Review." *Journal of Applied Microbiology* 104: 613-626.
- Kronvall, Göran, and Signe Ringertz. 1991. "Antibiotic Disk Diffusion Testing Revisited. Review Article." *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 99: 295-306.
- Kurokawa, Ken, Takehiko Itho, Tomomi Kuwahara, Kenshiro Oshima, Hidehiro Toh, Atsushi Toyoda, Hideto Takami, Hidetoshi Morita, Vineet K. Sharma, Tulika P. Srivastava, Todd D. Taylor, Hideki Noguchi, Hiroshi Mori, Yoshitoshi Ogura, Dusko S. Ehrlich, Kikuji Itoh, Toshihisa Takagi, Yoshiyuki Sakaki, Tetsuya Hayashi, and Masahira Hattori M. 2007. "Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes." *DNA Research* 14: 169-181.
- Lipsitch, Marc, Randall S. Singer, and Bruce R. Levin. 2002. "Antibiotics in Agriculture: When is it Time to Close the Door?" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:5752-5754.
- Lynch, Michael F., Robert V. Tauxe, and Craig W. Hedberg. 2009. "The Growing Burden of Foodborne Outbreaks Due to Contaminated Fresh Produce: Risks and Opportunities." *Epidemiology and Infection* 137: 307-315.
- Martínez-Martínez, Luis, and Jorge Calvo. 2010. "The Growing Problem of Antibiotic Resistance in Clinically Relevant Gram-negative Bacteria: Current Situation." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28 (3): 25-31.
- McManus, Patricia S., Virginia O. Stockwell, George W. Sundin, and Alan L. Jones. 2002. "Antibiotic Use in Plant Agriculture." *Annual Review of Phytopathology* 40:443-465.
- Phillips, Ian, Mark Casewell, Tony Cox, Brad De Groot, Christian Friis, Ron Jones, Charles Nightingale, Rodney Preston, and John Waddel. 2004. "Does the Use of Antibiotics in Food Animals Pose a Risk to Human Health? A Critical Review of Published Data." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:28-52.

RICO ET. AL: ENTEROBACTER CLOACAE IN FRESH VEGETABLES

- Sarmah, Ajit K., Michael T. Meyer, and Alistair B. Boxall. 2006. "A Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (Vas) in the Environment." *Chemosphere* 65:725-759.
- Schwaiger, Karin, Katharina Helmke, Christina S. Hölzel, and Johana Bauer. 2011a. "Antibiotic Resistance in Bacteria Isolated from Vegetables with Regards to the Marketing Stage (Farm vs. Supermarket)." *International Journal of Food Microbiology* 148: 191-196.
- Schwaiger, Karin, Katharina Helmke, Christina S. Hölzel, and Johana Bauer. 2011b. "Comparative Analysis of the Bacterial Flora of Vegetables Collected Directly from Farms and from Supermarkets in Germany." *International Journal of Environmental Health Research* 21: 161-172.
- Tyler, Heather L., and Eric W. Triplett. 2008. "Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria." *Annual Review of Phytopathology* 46:53-63.
- Venglovsky, Jan, Nada Sasakova, and Iveta Placha. 2009. "Pathogens and Antibiotic Residues in Animal Manures and Hygienic and Ecological Risks Related to Subsequent Land Application." *Bioresource Technology* 100:5386-5391.
- Vidaver, Anne K. 2002. "Uses of Antimicrobials in Plant Agriculture." *Clinical Infectious Diseases* 34 (Suppl. 3):107-110.
- Walsh, Ciara, and Seamus Fanning. 2008. "Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens: a Cause of Concern?" *Current Drugs Targets* 9:808-815.

ABOUT THE AUTHORS

Hortensia Rico: Hortensia is an Associate Professor in the department of Microbiology and Ecology at the University of Valencia. Her teaching experience covers General, Clinical and Food Microbiology. Her research activity is focused on microbial contamination of food, detection and quantification of bacterial pathogens and study of their resistance to antibiotics.

Daniel Gozalbo: Daniel is a full Professor in the department of Microbiology and Ecology at the University of Valencia. His teaching activity covers all areas of Microbiology. His research activity focused on fungal pathogens and, more recently, on microbial contamination and food safety.

Carlos Sebastián: Carlos is a pharmacist with many years of experience in the private sector of Clinical Analysis, particularly in microbial identification and antibiotic resistances. He is a regular collaborator of the department of Microbiology and Ecology at the University of Valencia.

María Pilar Falomir: Pilar is an Assistant Professor in the department of Microbiology and Ecology at the University of Valencia. Her teaching experience is in General Microbiology and Food Microbiology. Her research activity is focused on microbial contamination of food and determination of resistances to antibiotics.

3.5. PUBLICACIÓ 4

Falomir MP, Rico H and Gozalbo D (2013). *Enterobacter* and *Klebsiella* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10: 1002-1007.

ISSN: 1535-3141

Enterobacter and *Klebsiella* Species Isolated from Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain) and Their Clinically Relevant Resistances to Chemotherapeutic Agents

María Pilar Falomir, Hortensia Rico, and Daniel Gozalbo

Abstract

Occurrence of antibiotic-resistant pathogenic or commensal enterobacteria in marketed agricultural foodstuffs may contribute to their incorporation into the food chain and constitutes an additional food safety concern. In this work, we have determined the clinically relevant resistances to 11 common chemotherapeutic agents in *Enterobacter* and *Klebsiella* isolates from fresh vegetables from various sources (supermarkets and greengrocers' shops in Valencia, Spain). A total of 96 isolates were obtained from 160 vegetables analyzed (50% positive samples): 68 *Enterobacter* isolates (59 *E. cloacae*, two *E. aerogenes*, two *E. cancerogenus*, one *E. gergoviae*, and four *E. sakazakii*, currently *Cronobacter* spp.), and 28 *Klebsiella* isolates (19 *K. oxytoca* and 9 *K. pneumoniae*). Only seven isolates were susceptible to all agents tested, and no resistances to ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, and chloramphenicol were detected. Most isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid (74 [58 *Enterobacter* and 16 *Klebsiella*]) or to ampicillin (80 [55/25]). Other resistances were less frequent: nitrofurantoin (13 isolates [12/1]), tetracycline (6 [5/1]), co-trimoxazole (3 [3/0]), cefotaxime (1 [1/0]), and streptomycin (2 [1/1]). Multi-resistant isolates to two (56 [41/15]), three (10 *E. cloacae* isolates), four (one *E. cloacae* and one *K. pneumoniae* isolate), and five (two *E. cloacae* isolates) chemotherapeutic agents were also detected. The presence of potential pathogens points to marketed fresh produce, which often is eaten raw, as a risk factor for consumer health. In addition, these results support the usefulness of these bacterial species as indicators of the spreading of antibiotic resistances into the environment, particularly in the food chain, and suggest their role as carriers of resistance determinants from farms to consumers, which may constitute an additional "silent" food safety concern. Therefore, there is a need to improve the hygienic quality of marketed fresh vegetables, from better methods to prevent contamination in the farms to the use of sanitizing practices at home.

Introduction

FOODBORNE OUTBREAKS ASSOCIATED WITH consumption of fresh vegetables have been increasing steadily during the last decades (Tyler and Triplett, 2008; Lynch *et al.*, 2009). Most of the reported outbreaks of gastrointestinal diseases linked to the fresh produce have been associated with bacterial contamination, particularly with members of the *Enterobacteriaceae* family (Brandl, 2006; Heaton and Jones, 2008). Natural nonpathogenic epiphytic microorganisms are found in fresh vegetables; however, during growth, harvest, transportation, and further handling the produce can be contaminated with pathogens from animal and human sources. Availability of fresh vegetables, until recently considered as seasonal, has been extended over the whole year, and consumption of these produce has been increasing during the last years as ingredients of healthy diets, and considering that

these produce are often eaten raw, their microbial content could be a potential risk factor for consumer health (Brandl, 2006; Heaton and Jones, 2008).

We have previously shown the presence, at relatively high frequency, of some opportunistic bacterial pathogens, mostly belonging to the *Enterobacteriaceae* family, in vegetables that are eaten raw, purchased from markets of Valencia (Spain), pointing out that the consumption of fresh vegetables may represent a risk factor of infection for the growing immunocompromised population, and therefore a potential food safety concern in particular population subsets (Falomir *et al.*, 2010a; Falomir *et al.*, 2010b). There is an additional food safety concern related to the bacterial content in fresh vegetables, as the presence of antibiotic resistances both in epiphytic and pathogenic microorganisms in fresh vegetables may contribute to horizontal spreading of resistances among bacterial populations, indicating that fresh produce may play a role as a

Department of Microbiology and Ecology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot, Spain.

carrier and reservoir of antibiotic-resistant bacteria (Walsh and Fanning, 2008; Falomir *et al.*, 2010b; Schwaiger *et al.*, 2011a). Resistance to antimicrobial agents in clinically relevant Gram-negative bacteria is an increasingly important problem that in the last few years has spread from hospital settings to the community (Ho *et al.*, 2010; Martínez-Martínez and Calvo, 2010; Tzouveleakis *et al.*, 2012). Although hospitals and commercial animal husbandry are the prime areas for emergence of antibiotic resistances, the use of large amounts of antibiotics in plant agriculture has also contributed to the selection of resistant bacteria in plants, together with the application of manure from animal farming to agricultural fields, a common practice in the Spanish Mediterranean coast including the area of Valencia, or the use of contaminated water for irrigation (Lipsitch *et al.*, 2002; McManus *et al.*, 2002; Vidaver, 2002; Boehme *et al.*, 2004; Sarmah *et al.*, 2006). In addition, bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have a great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as vegetal surfaces or human colon, particularly considering that the intestine is a hot spot for horizontal gene transfer among microbes (Kurokawa *et al.*, 2007; Aminov, 2011; Baquero, 2012).

Coliform bacteria are commonly found in the intestinal tract of mammals and birds and therefore are indicators of fecal contamination. Numerous facultative pathogenic enterobacteria, such as *Enterobacter* and *Klebsiella* species, are also commonly found in water, soil, and vegetables (Brandl, 2006; Heaton and Jones, 2008; Tyler and Triplett, 2008). In addition, both *Enterobacter* and *Klebsiella* species, primarily *E. cloacae* and *K. pneumoniae*, and to a minor extent other species, have a significant clinical impact due to the emergence of antibiotic resistances worldwide, including Spanish and Valencian Autonomous region hospitals (Canton *et al.*, 2002; Gurtler *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2009; Diestra *et al.*, 2008; Seral *et al.*, 2010; Mezzatesta *et al.*, 2012; Polage *et al.*, 2012; Tzouveleakis *et al.*, 2012). The aim of this work was to determine the prevalence and antibiotic resistances of *Enterobacter* and *Klebsiella* species, in different fresh vegetables collected from various sources (mainly supermarkets and greengrocers), as an indicator of the spreading of the resistances into the environment, as well as of their potential risk to serve as a carrier of resistances from farms to consumers.

Materials and Methods

A total of 160 samples of fresh vegetables (several types of lettuce, rucola, lamb's lettuce, cucumber, tomato, carrot, spinach) were analyzed (Tables 1 and 2). Samples were collected directly from supermarkets and greengrocers' shops (*n* = 60) in Valencia city, the kitchen of two schools in Valencia (*n* = 90), including prepared salads (*n* = 20), as well as fourth range vegetables (minimally processed ready-to-eat fresh-cut vegetables, *n* = 40), also purchased from supermarkets and greengrocers' shops in Valencia, and directly from farms close to Valencia (*n* = 10). Samples were placed in sterile plastic bags, immediately transported to the laboratory, and processed upon arrival for their microbiological analysis. Selected samples of each vegetable (2–5 g) were directly (with no prior washing or sanitizing treatment) mixed with nine volumes of Tryptone water (MicroKit, Valdemorillo, Spain) and homogenized in a Classic Masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain), as previously described (Falomir *et al.*, 2010a, Falomir

TABLE 1. *ENTEROBACTER* ISOLATES FROM FRESH PRODUCE FROM GREENGROCERS' SHOPS AND SUPERMARKETS (INCLUDING FOURTH RANGE VEGETABLES AND PREPARED SALADS FROM SCHOOLS) AND SOME SAMPLES FROM FARMS

Vegetable sample	<i>Enterobacter</i> species (no. of isolates)
Tomato (<i>n</i> = 40)	<i>E. cloacae</i> (6)
Carrot (<i>n</i> = 10)	<i>E. cloacae</i> (7)
Lettuce romaine (<i>n</i> = 10)	<i>E. cloacae</i> (2)
Lettuce iceberg (<i>n</i> = 10)	<i>E. cloacae</i> (4)
Lettuce hearts (<i>n</i> = 10)	<i>E. cloacae</i> (4)
Cucumber (<i>n</i> = 10)	<i>E. cloacae</i> (2)
Lettuce iceberg (<i>n</i> = 20, fourth range)	<i>E. cloacae</i> (9) <i>E. aerogenes</i> (2)
Lamb's lettuce (<i>n</i> = 10, fourth range)	<i>E. cloacae</i> (3) <i>E. gergoviae</i> (1)
Rucola (<i>n</i> = 10, fourth range)	<i>E. cloacae</i> (7) <i>E. sakazakii</i> ^a (2)
Prepared salads (<i>n</i> = 20)	<i>E. cloacae</i> (12) <i>E. cancerogenus</i> (2) <i>E. sakazakii</i> ^a (1)
Tomato (<i>n</i> = 4, farm)	<i>E. cloacae</i> (1)
Lettuce romaine (<i>n</i> = 4, farm)	<i>E. cloacae</i> (2) <i>E. sakazakii</i> ^a (1)
Spinach (<i>n</i> = 2, farm)	None
Total (<i>n</i> = 160)	<i>E. aerogenes</i> (2) <i>E. cancerogenus</i> (2) <i>E. cloacae</i> (59) <i>E. gergoviae</i> (1) <i>E. sakazakii</i> ^a (4)

^aCurrently *Cronobacter* spp.

TABLE 2. *KLEBSIELLA* ISOLATES FROM FRESH PRODUCE PURCHASED FROM GREENGROCERS' SHOPS AND SUPERMARKETS (INCLUDING FOURTH RANGE VEGETABLES AND PREPARED SALADS FROM SCHOOLS) AND SOME SAMPLES FROM FARMS

Vegetable sample	<i>Klebsiella</i> species (number of isolates)
Tomato (<i>n</i> = 40)	<i>K. oxytoca</i> (3) <i>K. pneumoniae</i> (2)
Carrot (<i>n</i> = 10)	<i>K. oxytoca</i> (5) <i>K. pneumoniae</i> (2)
Lettuce romaine (<i>n</i> = 10)	<i>K. oxytoca</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1)
Lettuce iceberg (<i>n</i> = 10)	None
Lettuce hearts (<i>n</i> = 10)	<i>K. oxytoca</i> (2)
Cucumber (<i>n</i> = 10)	None
Lettuce iceberg (<i>n</i> = 20, fourth range)	<i>K. pneumoniae</i> (4) <i>K. oxytoca</i> (1)
Lamb's lettuce (<i>n</i> = 10, fourth range)	None
Rucola (<i>n</i> = 10, fourth range)	None
Prepared salads (<i>n</i> = 20)	<i>K. oxytoca</i> (6)
Tomato (<i>n</i> = 4, farm)	<i>K. oxytoca</i> (1)
Lettuce romaine (<i>n</i> = 4, farm)	None
Spinach (<i>n</i> = 2, farm)	None
Total (<i>n</i> = 160)	<i>K. oxytoca</i> (19) <i>K. pneumoniae</i> (9)

et al., 2010b). Samples from salads (4–8 g), containing all ingredients used for their preparation, were processed identically. Homogenates of the samples were inoculated in Brilliant Green Bile 2% Lactose (BGBL) broth and cultured at 37°C for 24–28 h to favor growth of lactose-fermenting Gram-negative bacteria (Soriano et al., 2000; Soriano et al., 2001). Positive cultures in BGBL broth (determined by growth/turbidity and gas production) were plated on selective media (EMB Levine agar) for Gram-negative bacteria to isolate single colonies; *Enterobacter* and *Klebsiella* isolates were identified by biochemical tests using the BBL Crystal E/NF identification system (Becton Dickinson, Sparks, MD). All isolates were identified with a confidence level >0.95, as indicated by the software provided by the manufacturer (Becton Dickinson) used to analyze the results of the biochemical tests. Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion according to standard microbiological procedures (CLSI, 2010). Disks of 11 antibacterial chemotherapeutic agents (most of them antibiotics) were used in this study (Liofilchem, Roseto, Italy): amoxicillin/clavulanic acid 30 µg, ampicillin 10 µg, cefotaxime 30 µg, ceftazidime 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, chloramphenicol 30 µg, co-trimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) 25 µg, streptomycin 10 µg, gentamicin 10 µg, nitrofurantoin 300 µg, and tetracycline 30 µg. Resistances to chemotherapeutic agents were deduced from the diameter of the growth inhibition areas, according to the known diameters for susceptibility and resistance provided by Liofilchem Diagnostici (Italy). Intermediate resistances were not considered in this study.

Results

Species belonging to *Enterobacter* and *Klebsiella* were isolated in 50% vegetal samples analyzed (80 of 160). Among the total number of isolates (96), 68 corresponded to *Enterobacter* species and 28 were identified as *Klebsiella* species (Tables 1 and 2). *E. cloacae* was the species more frequently isolated, since a total of 59 *E. cloacae* isolates were obtained (37% positive samples) (Table 1). Samples from supermarkets and greengrocers' shops were 33% positive for *E. cloacae* (20 of 60), individual vegetables from schools were 34% positive (24 of 70; salads were not considered, as they are a mix of vegetables; see below), whereas 30% of the samples collected from farms were positive (3 of 10). *E. cloacae* was detected in almost all vegetables species studied: 70% in carrot samples (7 of 10), 15% in tomato (7 of 44, including four samples from farm), 38% in lettuce (21 of 54, including lettuce hearts, fourth range samples, and samples from farm), 70% in rucola (7 of 10), 30% in lamb's lettuce (3 of 10), 20% in cucumber (2 of 10), whereas two spinach samples were free of *E. cloacae*. Similarly, samples of ready-to-eat prepared salads were 60% positive (12 of 20) for *E. cloacae*. Interestingly, the prevalence of *E. cloacae* in fourth range vegetables (47%, 19 positive samples of 40) was not diminished, but rather increased, compared with all other samples of fresh vegetables (28%, 28 isolates of 100). Other *Enterobacter* species were less frequently isolated: *E. sakazakii*, currently *Cronobacter* spp. (four isolates; 2.5% positive samples), *E. aerogenes* (two isolates; 1.2%), *E. cancerogenus* (two isolates; 1.2%), and *E. gergoviae* (one isolate; 0.6%); interestingly, most of these species were isolated from fourth range vegetables and seasoned ready-to-eat salads (Table 1).

Klebsiella isolates (28) corresponded to *K. oxytoca* (19) and *K. pneumoniae* (9). The overall frequency of isolation (18%

positive samples: 12% for *K. oxytoca* and 6% for *K. pneumoniae*) was lower than that found for *E. cloacae*, but higher than the other *Enterobacter* species, as cited above. Sixteen isolates (11 *K. oxytoca* and 5 *K. pneumoniae*) in vegetable samples were from supermarkets and greengrocers' shops (27% positive samples); five isolates (4 *K. oxytoca*, and one *K. pneumoniae*) were from fourth range samples (12.5% positive samples), and 6 *K. oxytoca* were isolated from prepared salads (30% positive samples). See Table 2 for further details.

Next, the resistances to 11 chemotherapeutic agents commonly used to deal with Gram-negative bacterial species were tested. Results obtained for *Enterobacter* isolates are shown in Table 3. Among the 59 *E. cloacae* isolates, only four were susceptible to all agents tested. Most *E. cloacae* isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid (51 isolates) or to ampicillin (52). Resistances to other chemotherapeutic agents were less frequent: 11 isolates were resistant to nitrofurantoin, five isolates were resistant to tetracycline, and three isolates resistant to co-trimoxazole were found, as well as one resistant isolate to cefotaxime and another one to streptomycin. Interestingly, most *E. cloacae* isolates showed resistance to several agents: resistance to two agents (amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin) was found in 48 isolates, and one isolate was resistant to ampicillin and nitrofurantoin; 10 isolates were resistant to three agents: amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin and tetracycline (two isolates), amoxicillin/clavulanic

TABLE 3. RESISTANCE PATTERNS OF *ENTEROBACTER* ISOLATES FROM FRESH PRODUCE

Isolate (number)	Resistances
<i>E. aerogenes</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin
<i>E. aerogenes</i> (1)	Nitrofurantoin
<i>E. cancerogenus</i> (2)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin
<i>E. cloacae</i> (4)	None
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin
<i>E. cloacae</i> (3)	Amoxicillin/clavulanic acid
<i>E. cloacae</i> (37)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin, nitrofurantoin
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin, nitrofurantoin, tetracycline
<i>E. cloacae</i> (1)	Ampicillin, co-trimoxazole, nitrofurantoin
<i>E. cloacae</i> (2)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, tetracycline
<i>E. cloacae</i> (6)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, nitrofurantoin
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, co-trimoxazole, tetracycline
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cefotaxime, nitrofurantoin, co-trimoxazole
<i>E. cloacae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, nitrofurantoin, streptomycin, tetracycline
<i>E. gergoviae</i> (1)	None
<i>E. sakazakii</i> ^a (4)	Amoxicillin/clavulanic acid

Only resistances to the 11 chemotherapeutic agents tested are shown; intermediate resistances are not considered.

^aCurrently *Cronobacter* spp.

acid, ampicillin and nitrofurantoin (six isolates), ampicillin, co-trimoxazole, nitrofurantoin (one isolate), and ampicillin, nitrofurantoin and tetracycline (one isolate); one isolate showed multiresistance to four chemotherapeutic agents (amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, co-trimoxazole and tetracycline), and two isolates were resistant to five chemotherapeutic agents: amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cefotaxime, nitrofurantoin and co-trimoxazole (one isolate), and amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, nitrofurantoin, streptomycin, and tetracycline (one isolate). Results concerning other *Enterobacter* species showed similar results, as all four *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, two *E. cancerogenus* and one *E. aerogenes* isolates were resistant to both ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid, whereas one *E. aerogenes* isolate was resistant to nitrofurantoin and the *E. gergoviae* isolate was susceptible to all antibiotics tested (Table 3).

The resistance patterns obtained for *Klebsiella* isolates are shown in Table 4. Only two isolates (*K. oxytoca*) were susceptible to all agents tested, and most isolates showed resistance to ampicillin and/or to amoxicillin/clavulanic acid. Interestingly, one *K. pneumoniae* isolate showed multiresistance to four antibiotics (ampicillin, nitrofurantoin, tetracycline, and streptomycin).

Discussion

Our results indicate that bacterial species belonging to *Enterobacter* and *Klebsiella* are common bacteria in fresh vegetables, and that during processing of vegetables to prepare ready-to-eat fourth range products, bacterial contamination is not significantly diminished, because an actual increase in bacteria was detected for *E. cloacae*; this observation agrees with previous results indicating that the standard washing of vegetal samples with water prior to the microbiological analysis did not significantly improve their content in enterobacteria, indicating that these bacterial species possess mechanisms for attachment to vegetal surfaces (Falomir *et al.*, 2010a, Falomir *et al.*, 2010b). A similar result was described earlier in lettuce samples from restaurants of the University of Valencia, as most samples were positive for coliforms and no significant decreases in total coliforms occurred in samples washed with water, as compared to unwashed samples, although a decrease of at least 1 log unit was observed when sodium hypochlorite or potassium permanganate solutions

were used in washing procedures (Soriano *et al.*, 2000). Bacterial ability to adhere to the surface of vegetables and/or internalization of bacteria within vegetal tissues (Brandl, 2006; Heaton and Jones, 2008; Tyler and Triplett, 2008) probably limits the usefulness of conventional processing and sanitizing methods to treat fresh vegetables, thus indicating that prevention of contamination is very important to control outbreaks associated with the consumption of fresh produce. As earlier mentioned, in the Spanish Mediterranean coast, including the area of Valencia, the use of manure as a fertilizer is a quite common practice that may contribute to bacterial contamination of soil, water, and therefore of vegetables. It should also be noted that our experimental procedure may underestimate the prevalence of enterobacteria in vegetable samples, because processing of amounts higher than 2–5 g would result in an increased percentage of positive samples; nevertheless, this observation additionally supports the results reported in this work.

Interestingly, most isolates were resistant to extensively used antibiotics, such as the β -lactams amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin, whereas resistances to third-generation cephalosporins, such as cefotaxime and ceftazidime, which have been used in a much more limited way, were infrequent. Our study is the first, as far as we know, that describes clinically relevant resistances to antibiotics in enterobacteria isolates from fresh vegetables in Spain, particularly in the irrigated fertile area of Valencia, which is known for its agricultural production, and confirms preliminary observations by our group (Falomir *et al.*, 2010b). As mentioned earlier, antibiotics are widely used in agriculture and in animal livestock production (Lipsitch *et al.*, 2002; McManus *et al.*, 2002; Vidaver, 2002), leading to selection of resistant bacteria, particularly in the gastrointestinal tract of animals; both resistant bacteria and nonabsorbed antibiotics are excreted by animals in manure and waste-holding systems (Blanco *et al.*, 2009; Venglovsky *et al.*, 2009). Therefore, application of manure, a common disposal method used in Spain, including Valencia, and other countries, including the United States, or the use of contaminated irrigation water, are means for environmental entry of both antibiotics and genetic resistance determinants to soil and plants; this points out that issues concerning environmental contamination and transmission of antibiotic-resistant bacteria through livestock manure should be fully addressed and that there is a need to improve environmental regulation concerning manure management practice (Sarmah *et al.*, 2006; Aarestrup *et al.*, 2008; Chee-Sanford *et al.*, 2009; Venglovsky *et al.*, 2009).

Our results support the notion that microbial contamination of fresh vegetables with opportunistic pathogens, such as *E. cloacae*, *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *K. pneumoniae*, and other species, should be considered a food safety concern, particularly in debilitated or immunocompromised individuals, and also that fresh produce can play a role as a carrier of antibiotic-resistant bacteria from farm to consumer (Falomir *et al.*, 2010a; Falomir *et al.*, 2010b; Schwaiger *et al.*, 2011a; Schwaiger *et al.*, 2011b). It should be noted, according to their potential clinical relevance, that numerous *E. cloacae* isolates showed multiresistance to three or more agents, confirming the emergence of antibiotic resistances within the *E. cloacae* complex and their spreading into the environment, and that one *K. pneumoniae* showed resistance to four agents (Martínez-Martínez and Calvo, 2010; Mezzatesta *et al.*, 2012; Tzouveleki *et al.*, 2012). Since bacteria harboring resistance determinants

TABLE 4. RESISTANCE PATTERNS OF *KLEBSIELLA* ISOLATES FROM FRESH PRODUCE

Isolate (number)	Resistances
<i>K. oxytoca</i> (10)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin
<i>K. oxytoca</i> (7)	Ampicillin
<i>K. oxytoca</i> (2)	None
<i>K. pneumoniae</i> (2)	Ampicillin
<i>K. pneumoniae</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic acid
<i>K. pneumoniae</i> (5)	Amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin
<i>K. pneumoniae</i> (1)	Ampicillin, nitrofurantoin, tetracycline, streptomycin

Only resistances to the 11 chemotherapeutic agents tested are shown; intermediate resistances are not considered.

may have great influence on resistance gene transfer in natural habitats, such as the human colon, which is a "hot spot" for horizontal gene transfer between microbes (Kurokawa *et al.*, 2007; Aminov, 2011; Baquero, 2012), the presence of antibiotic resistance determinants in *Enterobacteriaceae* species in fresh vegetables may constitute an additional food safety concern. However, any possible relationship between *E. cloacae* or *K. pneumoniae* in fresh vegetables and clinical isolates still has to be unequivocally demonstrated.

Conclusions

The presence of antibiotic resistances, and particularly multiresistances, in *Enterobacter* and *Klebsiella* species (mainly *E. cloacae*, and *K. oxytoca* and *K. pneumoniae* to a minor extent) in fresh vegetables supports their usefulness to serve as an indicator of the spreading of antibiotic resistances into the environment, as well as a carrier of resistance determinants from farm to consumers, probably contributing to the spreading of resistances to gut commensal and pathogenic microbiota through horizontal gene transfer. Although the extent of this phenomenon in spreading bacterial resistances into the community has to be studied further, a significant role of fresh produce in the dissemination of resistances should not be ruled out, as they are consumed worldwide over the entire year. Also, the consumption of antibiotics, sometimes not well controlled in the community, must be taken into account, since this may favor selection of resistances. This issue should be regarded as a "silent" food safety concern, as in most cases it may not directly affect consumer health, but may contribute to the increasing problem of resistances in Gram-negative bacteria. Therefore, there is a need to improve the hygienic quality of marketed fresh vegetables by using better methods to prevent contamination in the farms, including the improvement of environmental regulation concerning manure management practice, the use of efficient sanitizing practices both at home and restaurants, as well as appropriate handling from farms to markets to minimize further bacterial contamination and/or bacterial proliferation in fresh produce.

Acknowledgments

Support from the University of Valencia (Research Funds) is acknowledged.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 2008;6:733–750.
- Aminov RI. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* 2011;2:1–18.
- Baquero F. Metagenomic epidemiology: A public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(Suppl 4):67–73.
- Blanco G, Lemus JA, Grande J. Microbial pollution in wildlife: Linking agricultural manuring and bacterial resistance in red-billed choughs. *Environ Res* 2009;109:405–412.
- Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Mol Nutr Food Res* 2004;48:522–531.
- Brandl MT. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol* 2006;44:367–392.
- Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela MN, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 2002;40:1237–1243.
- Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Quality* 2009;38:1086–1108.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: CLSI, 2010.
- Díaz MA, Hernández JR, Martínez L, Rodríguez J, Pascual A, and Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEHI). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE Project, 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:503–510.
- Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, Moyá B, Curiao T, Pérez M, Cantón R, Oliver A, Navarro F, and Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI). Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:404–410.
- Falomir MP, Gozalbo D, Rico H. Coliform bacteria in fresh vegetables: From cultivated lands to consumers. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Volume 2*. Mendez-Vilas A (ed.). Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010a, pp. 1175–1181.
- Falomir MP, Gozalbo D, Sebastián C, Rico H. Detection and antibiotic susceptibility of coliform bacteria in fresh vegetables. In: *Microorganisms in Industry and Environment. From Scientific and Industrial Research to Consumer Products*. Mendez-Vilas A (ed.). Hackensack, NJ: World Scientific Publishing Co., 2010b, pp. 372–376.
- Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int Food Microbiol* 2005;104:1–34.
- Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: A review. *J Appl Microbiol* 2008;104:613–626.
- Ho J, Tambyah PA, Paterson DL. Multiresistant Gram-negative infections: A global perspective. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:546–553.
- Kurokawa K, Itho T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP, Taylor TD, Noguchi H, Mori H, Ogura Y, Ehrlich DS, Itoh K, Takagi T, Sakaki Y, Hayashi T, Hattori M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007;14:169–181.
- Lipsitch M, Singer RS, Levin BR. Antibiotics in agriculture: When is it time to close the door? *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5752–5754.
- Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiol Infect* 2009;137:307–315.
- Martínez-Martínez L, Calvo J. The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: Current situation. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:25–31.

- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 2002;40:443–465.
- Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: Clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* 2012;7:887–902.
- Polage CR, Solnick JV, Cohen SH. Nosocomial diarrhea: Evaluation and treatment of causes other than *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2012;55:982–989.
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere* 2006;65:725–759.
- Schwaiger K, Helmke K, Hölzel CS, Bauer J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *Int J Food Microbiol* 2011a;148:191–196.
- Schwaiger K, Helmke K, Hölzel CS, Bauer J. Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. *Int J Environ Health Res* 2011b;21:161–172.
- Seral C, Pardos M, Castillo FJ. Extended-spectrum beta-lactamases other than *Escherichia* and *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28(Suppl 1):12–18.
- Soriano JM, Rico H, Moltó JC, Mañes J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *Int J Food Microbiol* 2000;58:123–128.
- Soriano JM, Rico H, Moltó JC, Mañes J. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelet from restaurants. *Food Microbiol* 2001;18:159–163.
- Tyler HL, Triplett EW. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 2008;6:53–63.
- Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:682–707.
- Venglovsky J, Sasakova N, Placha I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour Tech* 2009;100:5386–5391.
- Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin Infect Dis* 2002;34(Suppl 3):107–110.
- Walsh C, Fanning S. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens: A cause of concern? *Curr Drug Targets* 2008;9:808–815.

Address correspondence to:

Daniel Gozalbo, PhD

Department of Microbiology and Ecology

Faculty of Pharmacy

University of Valencia

Avda. Vicent Andrés Estellés s/n

46100 Burjassot, Spain

E-mail: Daniel.gozalbo@uv.es

3.6. PUBLICACIÓ 5

Rico H, Gozalbo D, Sebastiá C and **Falomir MP** (2014). Resistances to beta-lactam antibiotics in *Enterobacteriaceae* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain). In: “*Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Status and Current Trends*” (Ed. A. Mendez Vilas). Wageningen Academic Publishers (Wageningen, The Netherlands), pp. 294-298.

ISBN: 978-90-8686-243-6

***Enterobacteriaceae* isolates resistant to beta-lactam antibiotics in fresh vegetables marketed in Valencia (Spain)**

H. Rico, D. Gozalbo and M. Pilar Falomir

Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, Universitat de València. Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Spain); e-mail: M.pilar.falomir@uv.es

Abstract

Resistances to beta-lactam antibiotics (amoxicillin/clavulanic, ampicillin, cefotaxime and ceftazidime) were determined in enterobacteria isolates from fresh vegetables (n: 150) marketed in Valencia city. A total of 118 isolates were obtained, belonging to the *Enterobacteriaceae* family (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Serratia*). Most isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic (86), ampicillin (89) or both (71); resistances to cefotaxime (2) or ceftazidime (1) were rare. One isolate (*E. cloacae*) was resistant to amoxicillin/clavulanic, ampicillin and cefotaxime, and another one (*C. freundii*) to all four antibiotics. Therefore, enterobacteria in fresh vegetables may serve as indicators of the spreading of resistances into the environment, as well as carriers of resistances to consumers. This points out the need for better methods to prevent contamination in the farms, including regulation concerning the use of antibiotics in livestock and agriculture, as well as sewage sludge and manure management, to improve the hygienic quality of fresh vegetables.

Keywords: beta-lactam antibiotics; clinical resistance to antibiotics; enterobacteria; fresh vegetables

1. Introduction

Resistance to beta-lactam antibiotics within *Enterobacteriaceae* is becoming commonplace in the nosocomial setting, as *Enterobacteriaceae* are a major cause of healthcare-associated infection, and during last years this problem has spread from the hospital to the community [1-4]. The rise of enterobacteria which are resistant to penicillins, cephalosporins and monobactams has reached high levels worldwide, including Spanish and Valencia hospitals [5-8]. The WHO developed a classification on the importance of antimicrobials used in human medicine in an effort to provide a tool for developing risk-management strategies to address antimicrobial use in agriculture and veterinary medicine, and beta-lactam antibiotics, such as penicillins and third generation cephalosporins, have been considered as critically important antimicrobials [9]. The use of large amounts of antibiotics in plant agriculture could lead to a selection of resistant bacteria [10-13], and applying manure from animal farming to agricultural fields or the use of contaminated water for irrigation could also spread resistant bacteria from animal and human sources to plants [14-17]. Besides, bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have great influence on horizontal transfer of resistance genes in natural habitats, such as vegetal surfaces or human colon [18-21]. Therefore, the presence of antibiotic-resistant bacteria in fresh vegetables may constitute an additional concern for consumer safety [22-25]

In addition, the irrigated fertile area of Valencia (Spain) is well known by its agricultural production, although some practices such as the use of manure as fertilizer may contribute to the bacterial contamination of vegetables. Therefore, the aim of this work was to determine the prevalence of clinically relevant resistances to four beta-lactam antibiotics (two penicillins: amoxicillin/clavulanic, and ampicillin, and two oxyiminocephalosporins: ceftazidime and cefotaxime) among enterobacteria species isolated from different fresh vegetables marketed in the city of Valencia, as an indicator of their potential risk to serve as a carrier of resistances from farms to consumers.

2. Materials and methods

A total of 150 samples of different fresh vegetables (lettuce, rucola, lamb's lettuce, cucumber, tomato, carrot) were analyzed. Samples were collected in Valencia city from various sources (supermarkets,

Food microbiology

greengrocer's shops), and analyzed by standardized microbiological methods for determination of coliforms and bacterial isolation and identification, as previously described [22-24]. Briefly, samples were placed in sterile plastic bags, immediately transported to the laboratory and processed upon arrival for their microbiological analysis. Selected samples of each vegetable (2-5 g) were directly (with no prior washing nor sanitizing treatment) added with nine volumes of Tryptone water (MicroKit, Valdemorillo, Spain), homogenized in a Classic Masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain) to obtain a 10^{-1} diluted homogenate; one mL of serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) in Tryptone water were then inoculated, in triplicate, in Brilliant Green Bile 2% Lactose Broth (Conda S.A, Madrid, Spain). After incubation for 24-28 h, the number of positive cultures (determined by turbidity and gas production) were used to determine the most probable number of coliforms (MPN/g). Positive cultures were plated on selective media (EMB Levine agar; Liofilchem, Roseto, Italy) to isolate single colonies, and isolates were identified by biochemical tests using the BBL Crystal E/NF identification system (Becton Dickinson, Loveton Circle Spark, MA, USA). Antibiotic susceptibility to beta-lactam antibiotics was determined by disk diffusion according to standardized microbiological procedures [26]. Disks of four antibiotics were used in this study: amoxicillin/clavulanic acid (Augmentine) 30 µg, ampicillin 10 µg, cefotaxime 30 µg, and ceftazidime 30 µg (Liofilchem, Roseto, Italy).

3. Results

More than half of vegetable samples (56%, including samples from all kind of fresh vegetables analyzed) were positive for coliforms; in most cases the bacterial burden showed limited values (< 2400 coliform bacteria/g), and roughly about 17% total samples showed higher levels (not shown). A total of 118 enterobacteria isolates were obtained, belonging to several genera (Tables 1 and 2): *Citrobacter*: *C. freundii* (four isolates); *Enterobacter*: *E. aerogenes* (two isolates), *E. cancerogenus* (two isolates), *E. cloacae* (56 isolates), *E. gergoviae* (one isolate), *E. sakazakii* (three isolates; currently *Cronobacter* spp.); *Escherichia*: *E. coli* (four isolates); *Hafnia*: *H. alvei* (two isolates); *Klebsiella*: *K. oxytoca* (19 isolates), *K. pneumoniae* (nine isolates); *Kluyvera*: *Kv. ascorbata* (four isolates), *Pantoea*: *P. agglomerans* (five isolates), and *Serratia*: *S. marcescens* (five isolates), *S. plymuthica* (one isolate), *S. rubidaea* (one isolate).

Table 1. Resistance of enterobacteria isolates from fresh vegetables to each of the four beta-lactam antibiotics assayed.

Species (number of isolates)	Resistances (number of isolates) ¹				
	None	AMP	AUG	CTX	CFZ
<i>C. freundii</i> (4)	0	3	4	1	1
<i>E. aerogenes</i> (2)	1	1	1	0	0
<i>E. cancerogenus</i> (2)	0	0	2	0	0
<i>E. cloacae</i> (56)	4	49	48	1	0
<i>E. gergoviae</i> (1)	1	0	0	0	0
<i>E. sakazakii</i> ² (3)	0	0	3	0	0
<i>E. coli</i> (4)	1	2	2	0	0
<i>H. alvei</i> (2)	0	1	2	0	0
<i>K. oxytoca</i> (19)	0	17	10	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (9)	0	8	6	0	0
<i>Kv. ascorbata</i> (4)	0	2	4	0	0
<i>P. agglomerans</i> (5)	2	2	2	0	0
<i>S. marcescens</i> (5)	3	2	2	0	0
<i>S. plymuthica</i> (1)	0	1	0	0	0
<i>S. rubidaea</i> (1)	0	1	0	0	0
TOTAL (118)	14 (12%)	89 (75%)	86 (73%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)

¹ AMP (ampicillin), AUG (ampicillin/clavulanic), CTX (cefotaxime), CFZ (ceftazidime)

² Currently *Cronobacter* spp.

Table 2. Multiresistances of the enterobacteria isolates from fresh vegetables to two or more beta-lactam antibiotics assayed.

Species (number of isolates) ¹	Resistances (number of isolates) ²		
	AMP/AUG	AMP/AUG/ CTX	AMP/AUG/CTX/CAZ
<i>C. freundii</i> (3/4)	2 (3)	0 (1)	1
<i>E. aerogenes</i> (1/2)	1	0	0
<i>E. cloacae</i> (45/56)	44 (45)	1	0
<i>E. coli</i> (1/4)	1	0	0
<i>H. alvei</i> (1/2)	1	0	0
<i>K. oxytoca</i> (10/19)	10	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (5/9)	5	0	0
<i>Kv. ascorbata</i> (2/4)	2	0	0
<i>P. agglomerans</i> (1/5)	1	0	0
<i>S. marcescens</i> (2/5)	2	0	0
TOTAL (71/118)	69 (71; 60%)	1 (2; 1,7%)	1 (0,8%)

¹ Only isolates showing resistance to more than one antibiotic are shown (multiresistant isolates/total isolates); bacterial species with no multiresistant isolates have not been included (but considered in the total number of isolates).

² The number in parenthesis indicates the total number of resistant isolates (including those with more resistances); AMP (ampicillin), AUG (ampicillin/clavulanic), CTX (cefotaxime), CAZ (ceftazidime).

Next, we determined in all enterobacteria isolates the presence of clinically relevant resistances to four commonly used beta-lactam antibiotics (Tables 1 and 2). Resistances to two penicillins (ampicillin and amoxicillin combined with clavulanic, a penicillin-related beta-lactamase inhibitor) and to two oxyiminocephalosporins (ceftazidime and cefotaxime) were selected as indicators of the prevalence of beta-lactam resistances within the microbiota of fresh vegetables. Most isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic (86 isolates) or to ampicillin (89 isolates), two widely used beta-lactam antibiotics; resistances to third generation cephalosporins, such as cefotaxime or ceftazidime were rare: only two isolates were resistant to cefotaxime and one was resistant to ceftazidime (Table 1). Accordingly, a significant number of isolates (71) were resistant to both to amoxicillin/clavulanic and ampicillin, and interestingly, among them one isolate (*E. cloacae*) was resistant to three antibiotics (amoxicillin/clavulanic, ampicillin and cefotaxime), and another one (*C. freundii*) was resistant to all four antibiotics assayed (Table 2). Only 14 isolates: *E. aerogenes* (one isolate), *E. cloacae* (four isolates), *E. gergoviae* (one), *E. coli* (one), *K. oxytoca* (two), *P. agglomerans* (two), and *S. marcescens* (three) did not show resistance to any antibiotic tested (Table 1 and 2).

4. Discussion

Our results confirm the presence of opportunistic bacterial pathogens in vegetables that are often eaten raw, either as epiphytic microbiota or as a result of contamination from soil or human sources [22, 27-30], pointing out that consumption of these produce may represent a risk factor for infection in the growing immunocompromised population, and consequently, may be regarded as a potential food safety concern in particular populations subsets, such as the elderly and hospitalized patients.

In addition, resistance to antibiotics in clinically relevant Gram-negative bacteria is an increasingly important problem, which during last years has spread from the hospital to the community, and resistance to beta-lactams is one of the main features of this situation in enterobacteria, being production of numerous beta-lactamases, often encoded by plasmid genes, responsible for these resistances [6-8,31-33]. Our results show that most enterobacteria in fresh vegetables are resistant to extensively used beta-lactams, such as amoxicillin/clavulanic and ampicillin, whereas resistances to third generation cephalosporins, such as cefotaxime and ceftazidime, are still infrequent. Therefore, fresh produce could play a role as a carrier of antibiotic resistant bacteria from farm to consumers. Since bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have great influence on resistance gene transfer in natural habitats [18-21], the presence of antibiotic-resistance determinants in *Enterobacteriaceae* species present in fresh vegetables may constitute an additional food safety concern. It should be noted that the intestine is a "hot spot" for horizontal gene transfer between microbes [19,21], and therefore antibiotic resistances could be horizontally disseminated, after ingestion by the consumer, to other gut commensal or pathogenic bacteria.

Food microbiology

The relative contribution of foodborne transmission to antimicrobial resistance in humans remains still unknown, but it is likely more significant than currently appreciated [34-37]. The high prevalence of enterobacteria in fresh vegetables (56% of samples were positive for coliforms) and the distinct frequency of resistance to beta-lactams suggest (i) their usefulness to serve as an indicator of the spreading of antibiotic resistances into the environment, and (ii) their potential role as a carrier of resistance determinants from farms to consumers, probably contributing to the spreading of resistances to gut microbiota through horizontal gene transfer. Despite the involvement of fresh vegetables in spreading bacterial resistances into the community needs further studies, their role in dissemination of resistances should be considered, since these produce are consumed worldwide over the whole year and the consumption of antibiotics, sometimes uncontrolled, in the community, may favor selection of resistances. Therefore, as we have recently proposed [24] this issue may be considered as a silent food safety concern contributing to the increasing problem of clinically relevant resistances of Gram-negative bacteria to antibiotics, pointing out the need to improve the hygienic quality of fresh vegetables, from better methods to prevent contamination on the farm (including regulation concerning the use of antibiotics in livestock and agriculture, as well as manure management) to the use of sanitizing practices at home.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Valencia (Research Funds).

References

- [1] Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine*. 2006; 34 (5 Suppl 1): S20-28.
- [2] Hidron AI, Edwards JR, Patel J, *et al*. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated to healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2008; 29: 996-1011.
- [3] Ho J, Tambyah PA, Paterson DL. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2010; 23: 546-553.
- [4] Logan LK. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging problem in children. *Healthcare Epidemiology*. 2012; 55: 852-859.
- [5] Canton R, Oliver A, Coque TM, *et al*. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 1237-1243.
- [6] Diestra K, Coque TM, Miró E, *at al*. Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in eleven Spanish hospitals (2004). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008; 26: 404-410.
- [7] Díaz MA, Hernández JR, Martínez L, *et al*. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE Project, 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009; 27: 503-510.
- [8] Seral C, Pardos M, Castillo FJ. Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010; 28 (Suppl. 1): 12-18.
- [9] Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FK. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Food Safety*. 2009; 49: 132-141.
- [10] Lipsitch M, Singer RA, Levin BR. Antibiotics in agriculture: when is it time to close the door? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2002; 99: 5752-5754.
- [11] McManus PS, Stockwell VO, Sudin GW, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*. 2002; 40: 443-465.
- [12] Sarmah G, Meyer MT, Boxall AB. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics in the environment. *Chemosphere*. 2006; 65, 725-759.
- [13] Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 34 (Suppl. 3): 107-110.
- [14] Blanco G, Lemus JA, Grande J. Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and

- bacterial resistance in red-billed choughs. *Environmental Research*. 2009; 109: 405-412.
- [15] Boehme S, Werner G, Klare I, Reisbrott R, Witte W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2004; 53: 28-52.
- [16] Smith DL, Harris AD, Johnson JA, *et al*. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistances in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2002; 99: 6434-6439.
- [17] Venglovsky J, Sasakova N, Placha I. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*. 2009; 100: 5386-5391.
- [18] Aminov R. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*. 2011; 2: 1-18.
- [19] Baquero F. Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012; 18 (Suppl. 4): 67-73.
- [20] Heuer H, Smalla K. Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety*. 2007; 6: 3-13.
- [21] Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, *et al*. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*. 2007; 14: 169-181.
- [22] Falomir MP, Gozalbo D, Rico H. Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. In: Mendez-Vilas A, ed. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Badajoz, Formatex Research Center. 2010: 1175-1181.
- [23] Falomir MP, Gozalbo D, Sebastián C, Rico H. Detection and antibiotic susceptibility of coliform bacteria in fresh vegetables. In: Mendez-Vilas A, ed. *Microorganisms in Industry and Environment: from Scientific and Industrial Research to Consumer Products*. Hackensack, World Scientific Publishing Co. 2010: 372-376.
- [24] Falomir MP, Rico H, Gozalbo D. *Enterobacter* and *Klebsiella* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2013 (PMID: 23980710; in press).
- [25] Schwaiger K, Helmke K, Hölzel S, Bauer J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 148: 191-196.
- [26] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. *Clinical Laboratory Standards Institute*. Wayne, PA.
- [27] Brandl MT. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*. 2006; 44: 367-392.
- [28] Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 104: 613-626.
- [29] Tyler HL, Triplett EW. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 2008; 46: 53-63.
- [30] Schwaiger K, Helmke K, Hölzel S, Bauer J. Comparative analysis of bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. *International Journal of Environmental Health Research*. 2011; 21: 161-172.
- [31] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54, 969-976.
- [32] Martínez L, Calvo J. The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010; 28 (Suppl. 2): 25-31.
- [33] Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, *et al*. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25: 682-707.
- [34] Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti-Infective Therapy*. 2008; 6: 733-750.
- [35] Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, *et al*. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*. 2009; 38: 1086-1108.
- [36] Collignon P, Angulo FL. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*: food for thought. *Journal of Infectious Diseases*. 2006; 194: 8-10.
- [37] Heuer OE, Hammerum AM, Collignon P, Wegener HC. Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 43: 911-916.

3.7. PUBLICACIÓ 6

Falomir MP, González P, Rico H and Gozalbo D (2014). Resistances to chemotherapeutic agents in *Enterobacteriaceae* isolates from organic fresh vegetables marketed in Valencia (Spain). *International Journal of Food Nutrition and Safety*, 5: 39-49.

ISSN: 2165-896X



Article

Resistances to Chemotherapeutic Agents in *Enterobacteriaceae* Isolates from Organic Fresh Vegetables Marketed in Valencia (Spain)

Pilar Falomir, Patricia González, Hortensia Rico, Daniel Gozalbo *

Department of Microbiology and Ecology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avenida Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Daniel.gozalbo@uv.es; Tel.: +34 963543026; Fax: +34 963544543.

Article history: Received 18 March 2014, Received in revised form 26 April 2014, Accepted 28 April 2014, Published 7 May 2014.

Abstract: The presence of antibiotic-resistant enterobacteria in fresh vegetables can be considered as a silent food safety concern, contributing to dissemination of resistances in the community. Here, we have studied the presence of *Enterobacteriaceae* isolates in organic fresh produce and the resistance of these isolates to eleven chemotherapeutic agents. A total of 50 samples of organic fresh vegetables (carrot, tomato, arugula and lettuce) marketed in Valencia (Spain) were analyzed. More than half of the vegetable samples analyzed (27 out of 50, 54%) were positive for the presence of coliform bacteria, including samples of all types of vegetables tested (90% arugula, 70% carrot, 50% lettuce and 10% tomato samples). A total of 37 isolates belonging to the *Enterobacteriaceae* family were identified: *Pantoea agglomerans* (nine isolates), *Serratia marcescens* (six) and *Enterobacter cloacae* (five), among others. Only five isolates were susceptible to all agents tested (13%), and no resistances to streptomycin, ceftazidime, ciprofloxacin, cotrimoxazole or chloramphenicol were found. Most isolates were resistant to ampicillin (31 out of 37), and 15 isolates showed resistance to amoxicillin/clavulanic. Resistances to other agents were less frequent: nitrofurantoin (six isolates), cefotaxime (four), tetracycline (two), and gentamicin (one). Multiresistances to two (ten isolates), three (one isolate) and four agents (five isolates) were also observed. These results point out that control of

organic fresh produce should be improved to avoid contamination with antibiotic-resistant bacteria, probably from human and/or animal origin, which can be considered as a serious issue concerning the quality of organic produce.

Keywords: antibiotic resistances; enterobacteria; fresh produce; organic food; food safety.

1. Introduction

Resistance to antimicrobial chemotherapeutic agents in *Enterobacteriaceae* is becoming commonplace in the nosocomial setting, where this family of Gram-negative bacteria constitutes a major cause of healthcare-associated infections, an issue that has spread from hospital to community over the last years (Ho et al., 2010; Tzouveleakis et al., 2012). The presence of opportunistic bacterial pathogens, mostly belonging to the *Enterobacteriaceae* family, in conventional fresh vegetables that are often eaten raw has been widely reported, and therefore consumption of these produce may represent a potential risk factor for the immunocompromised population (Falomir et al., 2010a,b; Schwaiger et al., 2011). Epiphytic non-pathogenic bacterial species are normally found in fresh vegetables, which can be contaminated with pathogens from animal or human sources during growth, harvest, transportation and further handling of the produce (Brandl, 2006; Heaton and Jones, 2008; Tyler and Triplett, 2008). Besides, the presence at relatively high frequencies of antibiotic-resistant bacteria in fresh vegetables may be considered as an additional silent food safety concern, as consumption of these produce may contribute to the spread of resistance determinants among commensal or pathogenic microbiota of consumers through horizontal gene transfer mechanisms, without causing any symptoms of disease (Falomir et al., 2010a,b, 2013a,b). Hospitals and commercial animal husbandry are considered the major areas for antibiotic resistance development. However, the use of large amounts of antibiotics in conventional plant agriculture, the application of manure from conventional animal farming to agricultural fields, and the use of contaminated water for irrigation, also contribute to the selection of resistant bacteria in plants (Vidaver, 2002; McManus et al., 2002; Boehme et al., 2004; Sarmah et al., 2006; Martí et al., 2013).

Contrary to conventional (non-organic) production of fresh produce, organic farming methods are characterized by a limited input of synthetic pesticides and chemical fertilizers, with livestock being reared with access to pasture and without the routine use of antibiotics and growth hormones (Drinkwater, 2009; Blair, 2011). Organic farming has substantially increased in Spain over the last decades, and organic production has been often considered to represent an increased microbiological risk for consumers, as compared to conventional farming, despite the fact that there is little available

evidence supporting this suggestion (Oliveira et al., 2010; Smith-Spangler et al., 2012). In addition, studies on the presence of antibiotic-resistant bacteria in organic fresh vegetables are scant, this being an important issue to show whether organic methods improve the quality of these produce by diminishing their content of resistant bacteria, a property that would be considered as an added value of organic fresh produce. Taking all this into consideration, we have determined in this work the presence of enterobacteria species, as well as their clinically relevant resistances to eleven common chemotherapeutic agents, in organic fresh vegetables marketed in the city of Valencia (Spain), whose irrigated fertile area is well known by its agricultural production, including organic vegetables.

2. Materials and Methods

A total of 50 samples of different organic fresh vegetables (arugula, tomato, carrot and two types of lettuce) were analyzed. Samples (ten of each vegetable type) were collected in the city of Valencia from four retail greengrocer's shops specialized in organic produce grown in the area of Valencia. Samples of each vegetable were purchased periodically every two weeks to avoid repeated sampling from the same batch. Determination of coliforms and bacterial isolation and identification were performed by standardized microbiological methods, as previously described (Falomir et al., 2010a,b, 2013a,b). Briefly, samples were placed in sterile plastic bags, immediately transported to the laboratory and processed upon arrival for their microbiological analysis. Selected samples of each vegetable (2-5 g) were directly (with no prior washing nor sanitizing treatment) added to nine volumes of Tryptone water (MicroKit, Valdemorillo, Spain), and homogenized in a Classic Masticator (IUL S.A., Barcelona, Spain) to obtain a 10^{-1} diluted homogenate; one mL of serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) in Tryptone water were then inoculated, in triplicate, in Brilliant Green Bile 2% Lactose Broth (Conda S.A., Madrid, Spain). After incubation for 24-48 h, the number of positive cultures (determined by turbidity and gas production) were used to determine the most probable number of coliforms (MPN/g). Positive cultures were plated on selective media (EMB Levine agar; Liofilchem, Roseto, Italy) to isolate single colonies, and isolates were identified by biochemical tests using the BBL Crystal E/NF identification system (Becton Dickinson, Loveton Circle Spark, MA, USA). All isolates were identified with a confidence >0.95 . Antibiotic susceptibility was determined by disk diffusion according to standard microbiological procedures (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010; Falomir et al, 2013a,b). Disks of eleven antibacterial chemotherapeutic agents (most of them antibiotics) were used in this study (Liofilchem, Roseto, Italy): amoxicillin/clavulanic acid 30 μ g, ampicillin 10 μ g, cefotaxime 30 μ g, ceftazidime 30 μ g, ciprofloxacin 5 μ g, chloramphenicol 30 μ g, co-trimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) 25 μ g, streptomycin 10 μ g, gentamicin 10 μ g, nitrofurantoin 300 μ g, and tetracycline 30 μ g. Clinical resistances to chemotherapeutic agents were

deduced from the diameter of the growth inhibition halos, according to the reported diameters for susceptibility and resistance.

3. Results and Discussion

Microbiological analysis of organic fresh vegetables was performed directly, without previous standard washing with water, as this treatment does not appear to cause a significant decrease of the bacterial burden, probably due to ability of microorganisms to adhere to vegetable surfaces (Falomir et al., 2010a,b, 2013a,b). Besides, this approach may better reflect the actual bacterial contamination of fresh produce. More than half of the vegetables samples analyzed (27 out of 50, 54%) were positive for the presence of coliform bacteria, including samples of all types of vegetables tested (90% arugula, 70% carrot, 50% of both lettuce types and 10% tomato samples). In most cases, the bacterial burden was limited (<2400 coliforms/g), and only two samples (one carrot and one arugula) showed a higher coliform content (Table 1). A total of 37 isolates belonging to the *Enterobacteriaceae* family were identified: *Pantoea agglomerans* (nine isolates), *Serratia marcescens* (six), *Enterobacter cloacae* (five), *Enterobacter aerogenes* (three), *Enterobacter cancerogenus* (two), *Cronobacter sakazakii* (two), *Hafnia alvei* (two), *Klebsiella oxytoca* (two), *Kluyvera cryocrescens* (two), among others (Table 1). The number of isolates varied among vegetable samples according to the bacterial burden: twelve isolates were obtained from arugula samples, ten from carrots, seven and six from red leaf and romaine lettuce respectively, and two from tomato samples. Comparison with previously reported observations by our group, concerning enterobacteria content in conventional fresh vegetables also marketed in Valencia city, show similar bacterial burden both in conventional and organic produce, with the pattern of identified species being similar (Falomir et al., 2010a,b, 2013a,b), with only minor differences, as the most frequently isolated species in conventional produce were *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella* spp, whereas *P. agglomerans* and *S. marcescens* were the most frequently identified species in organic fresh vegetables. The absence of significant differences in the bacterial content between conventional and organic fresh vegetables are not surprising, as they share common sources of bacterial contamination, such as the application of manure, a common disposal method used in Spain, including Valencia, and other countries, including United States, or the use of contaminated irrigation water (Boehme et al., 2004; Sarmah et al., 2006; Martí et al., 2013). In addition, our results agree with previous observations showing that differences in the prevalence of bacterial contamination between organic and conventional products are not statistically significant (Smith-Spangler et al., 2012), although a previous report showed a highest content of enterobacteria in fresh lettuces from organic production in Spain (Oliveira et al., 2010). It should also be noted that most of the species identified are opportunistic human pathogens, and consequently represent a potential risk factor for

immunocompromised consumers, as previously reported for conventional non-organic raw produce (Falomir et al, 2010a,b, 2013a,b).

Table 1. Enterobacteria species isolated from organic fresh produce

Vegetable sample (n)	MPN ^a (n)	Identified species (n)
Carrot (10)	>2400 (1)	<i>Cronobacter sakazakii</i> (1)
	4-480 (6)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)
	<3 (3)	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1)
		<i>Enterobacter cloacae</i> (2)
		<i>Escherichia vulneris</i> (1)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (2)
		<i>Serratia marcescens</i> (1)
Lettuce (romaine) (10)	3-43 (5)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)
	<3 (5)	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1)
		<i>Serratia marcescens</i> (3)
Lettuce (red leaf) (10)	3-1100 (5)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)
	<3 (5)	<i>Hafnia alvei</i> (2)
		<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (3)
Tomato (10)	43 (1)	<i>Pantoea agglomerans</i> (1)
	<3 (9)	<i>Serratia marcescens</i> (1)
Arugula (10)	>2400 (1)	<i>Cronobacter sakazakii</i> (1)
	2-1100 (8)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)
	<3 (1)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
		<i>Kluyvera ascorbata</i> (1)
		<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)
		<i>Leclercia adecarboxylata</i> (1)
		<i>Pantoea agglomerans</i> (3)
<i>Serratia marcescens</i> (1)		

Note: ^a Most probable number of coliform bacteria/g; detection limits: >2400 (positive cultures) and <3 (negative cultures).

Furthermore, we investigated the presence of clinically relevant resistances to eleven commonly used antimicrobial chemotherapeutic agents in all enterobacteria isolates (Table 2). Only

five isolates were susceptible to all agents tested (13%), and no resistances were found to streptomycin, ceftazidime, ciprofloxacin, co-trimoxazole or chloramphenicol. Most isolates were resistant to ampicillin (31 out of 37, 84%), and 15 isolates showed resistance to amoxicillin-clavulanic (40%). Resistances to other agents were less frequent: nitrofurantoin (six isolates, 16%), cefotaxime (four isolates, 11%), tetracycline (two isolates, 5.4%), and gentamicin (1 isolate, 2.7%). Ten isolates (27%) showed resistance to two agents: amoxicillin-clavulanic and ampicillin (eight isolates), ampicillin and tetracycline (one isolate) and ampicillin and gentamicin (one isolate); one isolate (2.7%) was resistant to three agents (ampicillin, amoxicillin-clavulanic, and nitrofurantoin), and five (13.5%) isolates (two *E. cloacae*, and one *C. sakazakii*, *P. agglomerans* and *S. marcescens*) were resistant to four agents: ampicillin, amoxicillin-clavulanic, nitrofurantoin and cefotaxime (four isolates), and ampicillin, amoxicillin-clavulanic, nitrofurantoin and tetracycline (one isolate). These results are similar to those previously reported by our group in conventional fresh produce marketed in Valencia (Falomir et al., 2010a,b, 2013a,b). Resistance to ampicillin was the most frequently found, both in conventional and organic produce (80 and 84% respectively); resistance to amoxicillin-clavulanic was more frequent in conventional (75%) than in organic produce (40%). Differences in the frequency of resistance to other agents tested, as well as the frequency of multiresistances, between organic (this study) and conventional produce were not significant. As mentioned above, the application of manure and/or the use of contaminated irrigation water are means for environmental entry of both antibiotics and genetic resistance determinants to soil and plants (Boehme et al., 2004; Sarmah et al., 2006; Martí et al., 2013). It should be noted that our study is restricted to a particular geographic area (Valencia, Spain), and further studies are required to validate this observation.

Therefore, consumption of organic fresh vegetables, as previously described for conventional produce, may be considered as an additional silent food safety concern, as it may favor the spreading of resistance determinants from farms to consumers, contributing to the increasing problem of antibiotic resistance in enterobacteria, since determinants of antibiotic resistances, often harbored in mobile genetic elements, can be horizontally transmitted, after ingestion of fresh produce, to other gut commensal or pathogenic bacteria (Kurokawa et al., 2007; Aminov, 2011; Baquero, 2012). The contribution of fresh produce, including organic fresh vegetables, to this process requires further studies. However, the extensive consumption of antibiotics in the community, which favors selection of resistant bacteria, and the worldwide consumption of these produce over the whole year, suggest a role of fresh produce in resistance dissemination. It should be noted that (i) identical drug resistance genes have been found in pathogenic Gram-negative species isolated worldwide from food sources (Peirano et al., 2010; Vincent et al., 2010), (ii) saprophytic bacteria in common fresh produce harbor drug resistance genes that are also found in internationally circulating strains of Gram-negative pathogens, suggesting that they may serve as a reservoir for antibiotic resistance genes that ultimately

may enter into human pathogens (Raphael et al., 2011).

Table 2. Resistance patterns of enterobacteria species isolated from organic fresh produce

Species (n)	Resistances ^a
<i>Cronobacter sakazakii</i> (1)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic, cefotaxime, nitrofurantoin
<i>Cronobacter sakazakii</i> (1)	None
<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)	Ampicillin
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	Ampicillin, tetracycline
<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1)	Ampicillin
<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1)	None
<i>Enterobacter cloacae</i> (3)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic, cefotaxime, nitrofurantoin
<i>Escherichia vulneris</i> (1)	Ampicillin
<i>Hafnia alvei</i> (1)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic
<i>Hafnia alvei</i> (1)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic, nitrofurantoin
<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	Ampicillin
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	Ampicillin
<i>Kluyvera ascorbata</i> (1)	Ampicillin
<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)	Ampicillin
<i>Kluyvera cryocrescens</i> (1)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic
<i>Leclercia adecarboxylata</i> (1)	None
<i>Pantoea agglomerans</i> (1)	Amoxicillin/clavulanic
<i>Pantoea agglomerans</i> (4)	Ampicillin
<i>Pantoea agglomerans</i> (1)	Ampicillin, gentamicin
<i>Pantoea agglomerans</i> (1)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic, cefotaxime, nitrofurantoin
<i>Pantoea agglomerans</i> (2)	None
<i>Serratia marcescens</i> (2)	Ampicillin
<i>Serratia marcescens</i> (3)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic
<i>Serratia marcescens</i> (1)	Ampicillin, amoxicillin/clavulanic, nitrofurantoin, tetracycline

Note: ^a Only clinical resistances to the eleven chemotherapeutic agents assayed are shown; intermediate resistances are not considered.

All these observations point out that control of organic fresh produce should be improved to avoid contamination with antibiotic-resistant bacteria, probably from human and/or animal origin, which can be considered as a serious issue concerning the quality of organic produce. In this context, a

recent study has shown that soil receiving manure is enriched in antibiotic-resistant bacteria, and consumption of fresh vegetables represents a route of human exposure to antibiotic resistances present in soil (Martí et al., 2013). Overall, issues concerning environmental contamination and transmission of antibiotic-resistant bacteria through livestock manure should be fully addressed and there is a need to improve environmental regulation concerning manure management practices (Sarmah et al., 2006; Aarestrup et al., 2008; Chee-Sanford et al., 2009; Venglovsky et al., 2009). A paradigm that shows the seriousness of entering resistant bacterial pathogens into the food chain is the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* that can be transmitted through oral consumption (Manges and Johnson, 2012; Fischer et al., 2013). The routine testing of food products and prompt political decisions to deal with this public health issue have been recently proposed (Kluytmans et al., 2013).

4. Conclusions

Consumption of fresh vegetables contaminated with antibiotic-resistant enterobacteria may be considered an additional silent food safety concern, as it may favor the spreading of resistance determinants from farms to consumers, contributing to the increasing problem of antibiotic resistance in enterobacteria. Our results show that control of organic fresh produce should be improved to avoid contamination with antibiotic-resistant bacteria, probably from human and/or animal origin, which can be considered as a serious issue concerning quality of organic produce. Therefore, the absence or the low content of antibiotic-resistant bacteria should be regarded as a desirable property of organic fresh produce that would confer it an added value. As a consequence of these results, we propose (i) to quantify antibiotic-resistant bacteria in organic fresh produce as an indicator of their microbial quality, and (ii) to include routine testing of fresh vegetables to detect antibiotic-resistant bacterial pathogens in order to protect public health.

Acknowledgements

Support from the University of Valencia (Ayuda a la Investigación) is acknowledged.

References

- Aarestrup, F. M, Wegener, H. C., and Collignon P. (2008). Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, **6**: 733-750.
- Aminov, R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.*, **2**: 1-18.
- Baquero, F. (2012). Metagenomic epidemiology: A public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, **18** (Suppl. 4): 67-73.

- Blair, R. (2011). *Meat in Organic Production and Food Quality: A Down to Earth Analysis*. Wiley-Blackwell, Oxford (UK).
- Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R., and Witte, W. (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Mol. Nutr. Food Res.*, **48**: 522-531.
- Brandl, M. T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**: 367-392.
- Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y. F., Yannarell, A. C., Maxwell, S., and Aminov, R. I. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J. Environ. Quality*, **38**: 1086-1108.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M100-S20, Wayne, PA.
- Drinkwater, L. E. (2009). Ecological knowledge: Foundation for sustainable organic agriculture. In: *Organic Farming: The Ecological System, Agronomy Monograph 54*, Francis, C. A. (Ed.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America (ASA-CSSA-SSA), Madison (WI), pp. 19-47.
- Falomir, M. P., Gozalbo, D., and Rico, H. (2010a). Coliform bacteria in fresh vegetables: From cultivated lands to consumers. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Mendez-Vilas, A. (Ed.). Formatex Research Center, Badajoz (Spain), Volume 2, pp. 1175-1181.
- Falomir, M. P., Gozalbo, D., Sebastiá, C., and Rico, H. (2010b). Detection and antibiotic susceptibility of coliform bacteria in fresh vegetables. In: *Microorganisms in Industry and Environment: From Scientific and Industrial Research to Consumer Products*, Mendez-Vilas, A. (Ed.). World Scientific Publishing Co., Hackensack (NJ), pp. 372-376.
- Falomir, M. P., Rico, H., and Gozalbo, D. (2013a). *Enterobacter* and *Klebsiella* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathog. Dis.*, **10**: 1002-1007.
- Falomir, M. P., Gozalbo, D., Sebastiá, C., and Rico H. (2013b). *Enterobacter cloacae* in fresh vegetables: A potential carrier of antibiotic resistances to consumers. *Food Studies Interdisc. J.*, **2**: 1-7.
- Fischer, J., Rodríguez, I., Schmoger, S., Friese, A., Roesler, U., Helmuth, R., and Guerra, B. (2013). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**: 478-80.
- Heaton, J. C., and Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: A review. *J. Appl. Microbiol.*, **104**: 613-626.

- Ho, J., Tambyah, P. A., and Paterson, D. L. (2010). Multiresistant Gram-negative infections: A global perspective. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **23**: 546-553.
- Kluytmans, J., Price, L., Grayson, L., Gottlieb, T., Mehtar, S., Andremont, A., Wegener, H. C., and Johnson, J. (2013). Enterobacteria: Ban resistant strains from food chain. *Nature*, **501**: 316.
- Kurokawa, K., Itho, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V. K., Srivastava, T. P., Taylor, T. D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D. S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T., and Hattori, M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.*, **14**: 169-181.
- Manges, A. R., and Johnson, J. R. (2012). Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.*, **55**: 712-719.
- Martí, R., Scott, A., Tien, Y., Murray, R., Sabourain, L., Zhang, Y., and Topp, E. (2013). The impact of manure fertilization and the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil, and on vegetables at harvest. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**: 5701-5709.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., and Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**: 443-465.
- Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., Anguera, M., Gatiús, F., and Abadías, M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiol.*, **27**: 679-684.
- Peirano, G., and Pitout, J. D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35**: 316-321.
- Raphael, E., Wong, L. K., and Riley, L. W. (2011). Extended-spectrum beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 1601-1607.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., and Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, **65**: 725-759.
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C. S., and Bauer, J. (2011). Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. *Int. J. Environ. Health Res.*, **21**: 161-172.
- Smith-Spangler, C., Brandeau, M. L., Hunter, G. E., Bavinger, J. C., Pearson, M., Eschbach, P. J., Sundara, V., Liu, H., Schirmer, P., Stave, C., Olkin, I, and Bravata, D. M. (2012). Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives? A systematic review. *Ann. Intern. Med.*, **157**: 348-66.
- Tyler, H. L., and Triplett, E. W. (2008). Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic

bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **6**: 53-63.

Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., and Daikos, G. L. (2012).

Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.*, **25**: 682-707.

Venglovsky, J., Sasakova, N., and Placha, I. (2009). Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour. Tech.*, **100**: 5386-5391.

Vidaver, A. K. (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin. Infect. Dis.*, **34**: 107-110.

Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C. M., Dutil, L., Galanakis, C., Reid-Smith, R. J., Tellier, P. P., Tellis, P. A., Ziebell, K., and Manges, A. R. (2010). Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg. Infect. Dis.*, **16**: 88-95.

3.8. PUBLICACIÓ 7

Falomir MP, Gozalbo D and Rico H (2014). Consumption of fresh vegetables: a risk factor for development of opportunistic bacterial infections in the elderly. En: “*Calidad de vida, cuidadores e intervención para la mejora de la salud en el envejecimiento*”, Vol. II, pp. 39-44. Ed. ASUNIVEP (Asociación Universitaria de Educación y Psicología, Almería, España).
ISBN: 878-84-617-0181-0

CAPÍTULO 4

Consumption of fresh vegetables: a risk factor for development of opportunistic bacterial infections in the elderly?

María Pilar Falomir, Daniel Gozalbo and Hortensia Rico
University of Valencia (Spain)

Ageing causes a progressive decline in the functional status of multiple organs and systems, leading to a variety of effects. Infectious diseases still remain a significant cause of morbidity and mortality in the elderly, who are more susceptible to infections and take longer to recover from these infections. This is in part due to alterations in the immune system (immunosenescence), as well as other factors, such as age-associated changes in drug metabolism, and a high prevalence of comorbidity and polymedication. Besides, there is wide evidence indicating that marketed fresh vegetables, that are frequently eaten raw, often contain opportunistic bacterial pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae* family that at relatively significant frequency are resistant to one or more commonly used antibacterial chemotherapeutic agents (mostly antibiotics). These bacterial species may cause a variety of opportunistic infections in debilitated people, such as the elderly, and therefore consumption of these produce may represent a risk factor for development of opportunistic infections, whose seriousness may be enhanced by the presence of antibiotic resistances. The objective of this work is to present a short and balanced review of this issue, particularly focused in the presence of antibiotic-resistant enterobacteria in fresh vegetables, in order to focus on the need for the adequate sanitizing methods of these fresh produce prior to consumption, particularly by aged people.

Alterations in immune system and in drug disposition in the elderly

It is well known that with increasing age, a progressive accumulation of cellular and molecular alterations does occur, leading to tissue dysfunction. This functional deterioration also affects the immune system, a phenomenon defined as immunosenescence. The major function of the immune system is to provide protection against fungal, bacterial and viral pathogens, in order to prevent infections. Therefore, the age-related decline of functional immunity leads to a diminished ability to respond to infection as well as to vaccination, contributing to the increased morbidity and mortality rates observed in the elderly. Immunosenescence has a considerable complexity and both innate and adaptive immune responses are affected by age. Although the precise mechanisms involved in immunosenescence are far to be completely understood, intrinsic defects (altered phenotype and function) in many cell types of the immune system contributing to the signs of immunosenescence have been already identified (Panda *et al.*, 2009; Show *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2013). In addition, the progressive decline in the functional status of multiple organs and systems can influence drug disposition in the elderly. Ageing is associated with changes in metabolism and bioavailability of drugs, and particularly pharmacokinetics are influenced mainly by the loss of kidney and liver function in people who are >65 years old, resulting in a variability in response to medicines, a relevant effect taking into account that comorbidity and polypharmacy are highly prevalent in the elderly (Aymanns *et al.*, 2010; McLachlan and Pont, 2012; Shi and Klotz, 2011). All these factors contribute to the increased susceptibility of aged people to opportunistic infections

Fresh vegetables as carriers of opportunistic bacterial pathogens

Foodborne outbreaks associated with consumption of fresh vegetables have been increasing steadily during last decades, and most cases have been associated with bacterial contamination, particularly with members of the *Enterobacteriaceae* family. Availability of fresh vegetables, up till recently considered as seasonal, has been extended over the whole year, and consumption of these produce has been increasing during the last years as ingredients of healthy diets (Heaton and Jones, 2008; Lynch *et al.*, 2009). Natural non-pathogenic epiphytic microorganisms are found in fresh vegetables, however during growth, harvest, transportation and further handling the produce can be contaminated with pathogens from animal and human sources. Contamination can arise as a consequence of treating soil with organic fertilisers, such as sewage sludge and manure, and from the irrigation water, as well as from the ability of bacteria to persist and proliferate in vegetables (Dupont, 2007; Heaton and Jones, 2008; Tyler and Triplett, 2008). Considering that

these produce are often eaten raw, their microbial content may represent a risk factor for the consumer's health and therefore a food safety problem (Brandl, 2006; Falomir *et al.*, 2010a,b).

Enterobacteria, and particularly the group of coliforms, are commonly found in the intestinal tract of mammals and birds and therefore are considered as indicators of fecal contamination. Numerous facultative pathogenic enterobacteria, such as species belonging to *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, as well as other genera, are also commonly found in water, soil and vegetables (Brandl, 2006; Heaton and Jones, 2008; Tyler and Triplett, 2008). There is evidence showing the presence, at relatively high frequency, of a variety of opportunistic bacterial pathogens, mostly belonging to the *Enterobacteriaceae* family, in marketed fresh vegetables that are eaten raw (such as distinct lettuce types, tomatoes, rucicola, carrots, cucumber, lamb's lettuce, etc) (Falomir *et al.*, 2010a,b; 2013a,b; Rico *et al.*, 2014; Schwaiger *et al.*, 2011a). The most frequently identified species in fresh vegetables from the area of Valencia (Spain) are: *Citrobacter* (*C. freundii*), *Enterobacter*: (*E. aerogenes*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii* currently *Cronobacter* spp.), *Escherichia* (*E. coli*); *Hafnia* (*H. alvei*), *Klebsiella* (*K. oxytoca*, *K. pneumoniae*), *Kluyvera* (*Kv. Ascorbata*), *Pantoea* (*P. agglomerans*), *Serratia*: (*S. marcescens*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*), among others. These observations include fresh vegetables marketed in retail greengrocer's shops and supermarkets, as well as both conventionally and organically grown vegetables. Most interestingly, similar contamination levels with enterobacteria have been detected in fourth range vegetables (cut ready to eat fresh produce), and ready to eat prepared salads, indicating that these bacteria are ingested by the consumers. Although usually pathogenic species (*Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, pathogenic *Escherichia coli* strains) are not found in marketed fresh produce, most of the bacterial species above mentioned are considered as opportunistic pathogens that can cause different infections in a wide variety of immunocompromised population, pointing out that consumption of fresh vegetables may represent a risk factor of infection for the growing immunocompromised population, and therefore a potential food safety concern in particular population subsets, such as the elderly (Falomir *et al.*, 2010a,b; 2013a,b). It should be noted that some studies have shown that standard washing of fresh vegetables with water prior to the microbiological analysis does not significantly improve their content in enterobacteria, and the use of sodium hypochlorite or potassium permanganate solutions in washing procedures is required to obtain a decrease in the coliform burden of fresh vegetables (Falomir *et al.*, 2010a,b Soriano *et al.*, 2000; 2001), indicating that these bacterial species possess mechanisms for attachment to vegetal surfaces (Brandl, 2006; Heaton and Jones, 2008; Tyler and Triplett, 2008).

Fresh produce as carriers of antibiotic-resistance determinants

There is an additional food safety concern related to the bacterial content in fresh vegetables, as the presence of antibiotic resistances both in epiphytic and pathogenic microorganisms in fresh vegetables may contribute to horizontal spreading of resistances among bacterial populations, indicating that fresh produce may play a role as a carrier and reservoir of antibiotic resistant bacteria (Falomir *et al.*, 2010b, 2013a,b; Schwaiger *et al.*, 2011b, Walsh and Fanning, 2008).

Resistance to antimicrobial agents in clinically relevant Gram-negative bacteria is an increasingly important problem, which in the last years has spread from hospital settings to the community (Hidron *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2010; Logan, 2012; Martínez-Martínez and Calvo, 2010; Paterson, 2006; Tzouveleki *et al.*, 2012). Although hospitals and commercial animal husbandry are the prime areas for emergence of antibiotic resistances, the use of large amounts of antibiotics in plant agriculture has also contributed to a selection of resistant bacteria in plants, together with (i) the application of manure from animal farming to agricultural fields, a common practice in the Spanish Mediterranean coast including the area of Valencia, and/or (ii) the use of contaminated water for irrigation (Blanco *et al.*, 2009; Boehme *et al.*, 2004; Lipsitch *et al.*, 2002; McManus *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2004; Sarmah *et al.*, 2006; Vidaver, 2002). Accordingly, enterobacteria isolated in fresh vegetables from the area of Valencia (Spain) showed clinical resistances to distinct commonly used antibacterial chemotherapeutic agents (most of them antibiotics). Most isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic, or to ampicillin, two widely used beta-lactam antibiotics; resistances to third generation cephalosporins, such as cefotaxime or ceftazidime, were less frequent, as resistances to other agents (tetracycline, nitrofurantoin, co-trimoxazole, streptomycin, and chloramphenicol). Interestingly, multiresistances were also detected to two agents (mostly to amoxicillin/clavulanic and ampicillin), as well as to three, four or even five agents, although at a lower, but significant, frequency (Falomir *et al.*, 2010b, 2013a,b; Rico *et al.*, 2014).

Humans are exposed to antimicrobial-resistant bacteria and resistance genes that are present in the food chain, and both antibiotic resistant commensal bacteria, or their resistance determinants are known to spread from animals to humans via the food chain (Aarestrup *et al.*, 2008; Chee-Sanford *et al.*, 2009; Collignon and Angulo, 2006; Heuer *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2002; Venglovsky *et al.*, 2009; Walsh and Fanning, 2008). The relative contribution of foodborne transmission to antimicrobial resistance in humans remains still unknown, but it is likely more significant than currently appreciated. The high prevalence of enterobacteria in fresh vegetables and the frequency of resistance to distinct antibacterial chemotherapeutics suggest their potential role as a carrier of resistance determinants from farms to consumers, probably contributing to the spreading of resistances to gut microbiota through horizontal gene transfer. Since bacteria serving as a reservoir for resistance determinants may have a great influence on resistance gene transfer in natural habitats (Aminov, 20011; Baquero, 2012; Heuer and Smalla, 2007; Kurokawa *et al.*, 2007), the presence of antibiotic-resistance determinants in *Enterobacteriaceae* species present in fresh vegetables may constitute an additional food safety concern. It should be noted that the intestine is a “hot spot” for horizontal gene transfer between microbes (Baquero, 2012; Kurokawa *et al.*, 2007), and therefore antibiotic resistances could be horizontally disseminated, after ingestion by the consumer, to other gut commensal or pathogenic bacteria.

Although the involvement of fresh vegetables in spreading bacterial resistances into the community needs further studies, their role in dissemination of resistances should be considered, since these produce are consumed worldwide over the whole year and the consumption of antibiotics, sometimes uncontrolled, in the community, may favor selection of resistances. Accordingly, we have proposed to consider this issue as a “silent” food safety concern (as resistance determinants may spread within the population without symptoms of disease) (Falomir *et al.* 2013a,b; Rico *et al.*, 2014), contributing to the increasing problem of clinically relevant resistances of Gram-negative bacteria to antibiotics. This points out the need to improve the hygienic quality of fresh vegetables, from better methods to prevent contamination on the farm (including regulation concerning the use of antibiotics in livestock and agriculture, as well as manure management) to the use of sanitizing practices at home.

Conclusions

Concerning the consumption of raw fresh produce by the elderly, several factors should be considered: (i) the presence of bacterial content, particularly of species belonging to the *Enterobacteriaceae* family, most of them considered as facultative pathogens able to cause a variety of infections in debilitated people, (ii) the presence of multiresistances to clinically used antibiotics that can spread to the consumer commensal or pathogenic gut microbiota, (iii) the functional deterioration of the immune system (immunosenescence) in the elderly, as well the alteration of drug metabolism due to functional alterations in several organs, such as liver and kidney, and (iv) the high prevalence of comorbidity and polypharmacy in the elderly. All these factors favor the consideration that consumption of fresh produce by the elderly may represent a risk factor, and therefore a food safety concern, for development of infectious diseases whose seriousness increases when the ethologic agent is a multiresistant bacteria. It should be noted that the bacterial species most frequently found in fresh vegetables species, such as *Enterobacter* and *Klebsiella* species, primarily *E. cloacae* and *K. pneumoniae*, and in a minor extent other species, have a significant clinical impact due to the emergence of antibiotic resistances worldwide, including Spanish and Valencian Autonomous region hospitals (Canton *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2008; Diestra *et al.*, 2008; Gurtler *et al.* 2005; Mezzatesta *et al.*, 2012; Polage *et al.*, 2012; Seral *et al.*, 2010; Tzouvelekis *et al.*, 2012). Therefore, although the consumption of fresh vegetables by aged people is desirable as ingredients of healthy diets, it is strongly recommended the use of sanitizing practices to significantly decrease the bacterial burden of fresh vegetables prior to consumption by the elderly, either at home and institutions (hospital, old people’s home). These measures should be complemented by the adequate hygienic manipulation of fresh produce to avoid spreading of bacteria to other foods by cross-contamination. In these context, a basic food hygiene education of the staff involved in food manipulation/cooking would be very helpful, as well as the routine microbiological controls.

References

- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C. and Collignon P. (2008). Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 6, 733-750.
- Aminov, R.I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1-18.

- Aymanns, C., Keller, F., Maus, S., Hartmann, B. and Czock, D. (2010). Review on pharmacokinetics and pharmacodynamics and the aging kidney. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(2), 314-327.
- Baquero, F. (2012). Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (Suppl. 4), 67-73.
- Blanco, G., Lemus, J.A. and Grande, J. (2009). Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial resistance in red-billed choughs. *Environmental Research*, 109, 405-412.
- Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R. and Witte, W. (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48, 522-531.
- Brandl, M.T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 367-392.
- Canton, R., Oliver, A., Coque, T.M., Varela, M.N., Pérez-Díaz, J.C. and Baquero, F. (2002). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1237-1243.
- Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.L., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.F., Yannarell, A.C., Maxwell, S. and Aminov, R.I. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*, 38, 1086-10108.
- Collignon, P. and Angulo, F.L. (2006). Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*: food for thought. *Journal of Infectious Diseases*, 194, 8-10.
- Díaz, M.A., Hernández, J.R., Martínez, L., Rodríguez, J., Pascual, A. and Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEHI) (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE Project, 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 503-5010.
- Diestra, K., Coque, T.M., Miró, E., Oteo, J., Nicolau, C.J., Campos, J., Moyá, B., Curiao, T., Pérez, M., Cantón, R., Oliver, A., Navarro, F. and Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) (2008). Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26, 404-410.
- DuPont, H.L. (2007). The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 1353-1361.
- Falomir, M.P., Gozalbo, D. and Rico, H. (2010a). Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. In Mendez-Vilas A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Volume 2, pp. 1175-1181). Badajoz (Spain): Formatex Research Center.
- Falomir, M.P., Gozalbo, D., Sebastián, C. and Rico, H. (2010b). Detection and antibiotic susceptibility of coliform bacteria in fresh vegetables. In Mendez-Vilas A. (Ed.), *Microorganisms in Industry and Environment. From Scientific and Industrial Research to Consumer Products* (pp. 372-376). Hackensack (NJ): World Scientific Publishing Co.
- Falomir, M.P., Gozalbo, D., Sebastián, C. and Rico, H. (2013a). *Enterobacter cloacae* in fresh vegetables: a potential carrier of antibiotic resistances to consumers. *Food Studies: An Interdisciplinary Journal*, 2, 1-7.
- Falomir, M.P., Rico, H. and Gozalbo, D. (2013b). *Enterobacter* and *Klebsiella* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 1002-1007.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L. and Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Food Microbiology*, 104, 1-34.
- Heaton, J.C. and Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 613-626.
- Heuer, H. and Smalla, K. (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety*, 6, 3-13.
- Heuer, O.E., Hammerum, A.M., Collignon, P. and Wegener, H.C. (2006). Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 911-916.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., Fridkin, S.K.; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated to healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29, 996-1011.

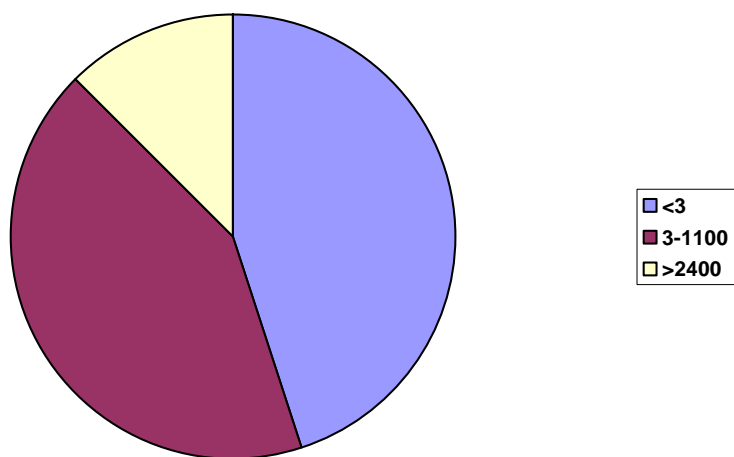
- Ho, J., Tambyah, P.A. and Paterson, D.L. (2010). Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23, 546-553.
- Kurokawa, K., Itho, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T. and Hattori, M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*, 14, 169-181.
- Lipsitch, M., Singer, R.S. and Levin, B.R. (2002). Antibiotics in agriculture: when is it time to close the door? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 5752-5754.
- Logan, L.K. (2012). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging problem in children. *Healthcare Epidemiology*, 55, 852-859.
- Lynch, M.F., Tauxe, R.V. and Hedberg, C.W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137, 307-315.
- Martínez-Martínez, L. and Calvo, J. (2010). The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 25-31.
- McLachlan, A.J. and Pont, L.G. (2012). Drug metabolism in older people, a key consideration in achieving optimal outcomes with medicines. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 67(2), 175-180.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W. and Jones, A.L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 443-465.
- Mezzatesta, M.L., Gona, F. and Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7, 887-902.
- Panda, A., Arjona, A., Sapey, E., Bai, F., Fikrig, E., Montgomery, R.R., Lord, J.M. and Shaw, A.C. (2009). Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends in Immunology*, 30: 325-333.
- Paterson, D.L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine*, 34 (5 Suppl 1), S20-28.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. and Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 28-52.
- Polage, C.R., Solnick, J.V. and Cohen, S.H. (2012). Nosocomial diarrhea: evaluation and treatment of causes other than *Clostridium difficile*. *Clinical Infectious Diseases*, 55, 982-989.
- Rico, H., Gozalbo, D., Sebastiá, C. and Falomir, M.P. (2014). Resistances to beta-lactam antibiotics in *Enterobacteriaceae* species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain). In Mendez-Vilas A. (Ed.), *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends*. Wageningen (The Netherlands): Wageningen Academic Publishers (in press).
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T. and Boxall, A.B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, 65:725-759.
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C.S. and Bauer, J. A. (2011a). Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal of Food Microbiology*, 148, 191-196.
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C.S. and Bauer, J. (2011b). Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. *International Journal of Environmental Health Research*, 21, 161-172.
- Seral, C., Pardos, M. and Castillo, F.J. (2010). Extended-spectrum beta-lactamases other than *Escherichia* and *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (Suppl. 1), 12-18.
- Shi, S. and Klotz, U. (2011). Age-related changes in pharmacokinetics. *Current Drug Metabolism*, 12 (7): 601-610.
- Show, A.C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A. and Lord, J.M. (2012). Aging of the innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 22, 507-513.
- Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K. and Morris, J.G. Jr. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistances in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 6434-6439.

- Soriano, J.M., Rico, H., Moltó, J.C. and Mañes, J. (2000). Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 123-128.
- Soriano, J.M., Rico, H., Moltó, J.C. and Mañes, J. (2001). Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiology*, 18, 159-163.
- Su, D.M., Aw, D. and Palmer, D.B. (2013). Immunosenescence: a product of the environment? *Current Opinion in Immunology*, 25, 498-403.
- Tyler, H.L. and Triplett, E.W. (2008). Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 6, 53-63.
- Tzouveleki, L.S., Markogiannakis, A., Psichogiou, M., Tassios, P.T. and Daikos, G.L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 682-707.
- Venglovsky, J., Sasakova, N. and Placha, I. (2009). Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*, 100, 5386-5391.
- Vidaver, A.K. (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (Suppl 3), 107-110.
- Walsh, C. and Fanning, S. (2008). Antimicrobial resistance in foodborne pathogens: a cause of concern? *Current DrugTargets*, 9, 808-815.

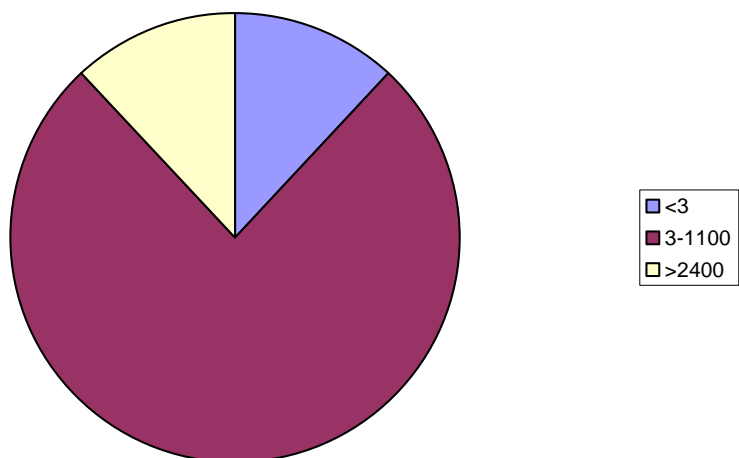
3.9. ANNEX I

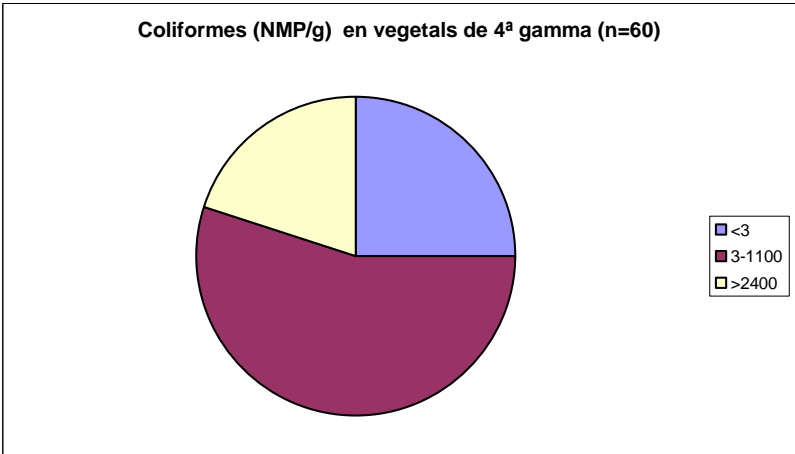
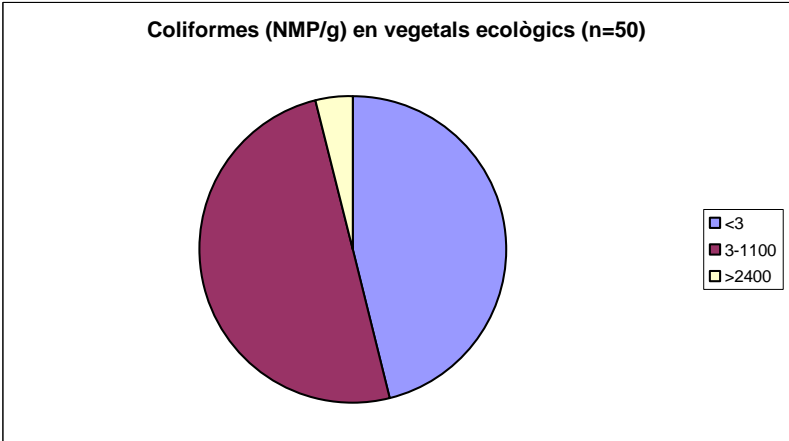
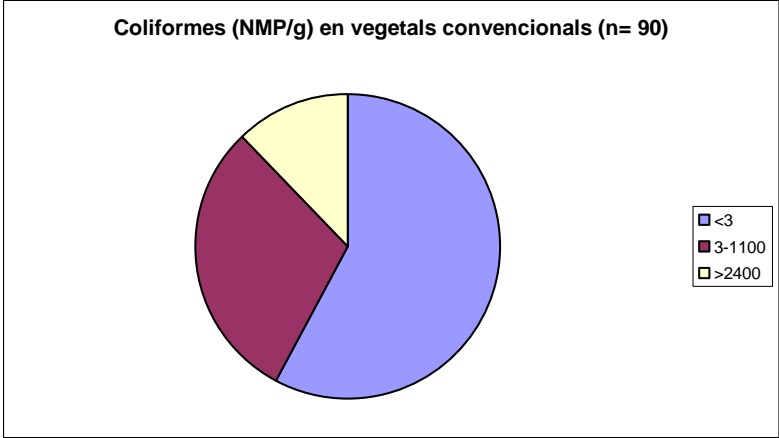
Coliformes (NMP/g) en productes vegetals frescos

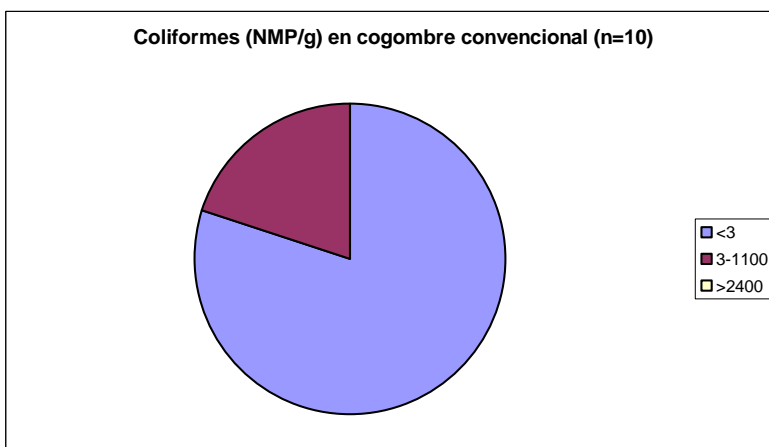
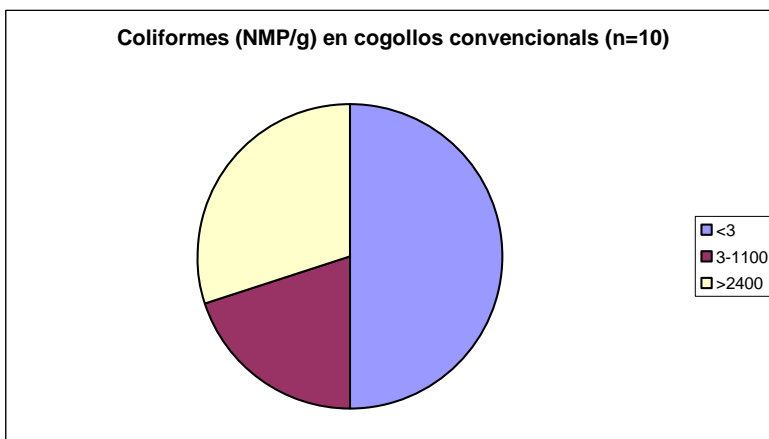
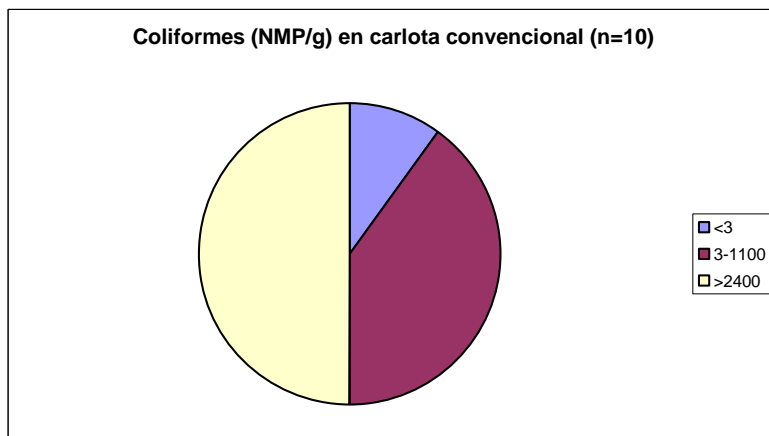
**Coliformes (NMP/g) en productes vegetals frescos
(convencionals, ecològics i 4^a gamma) (n=200)**

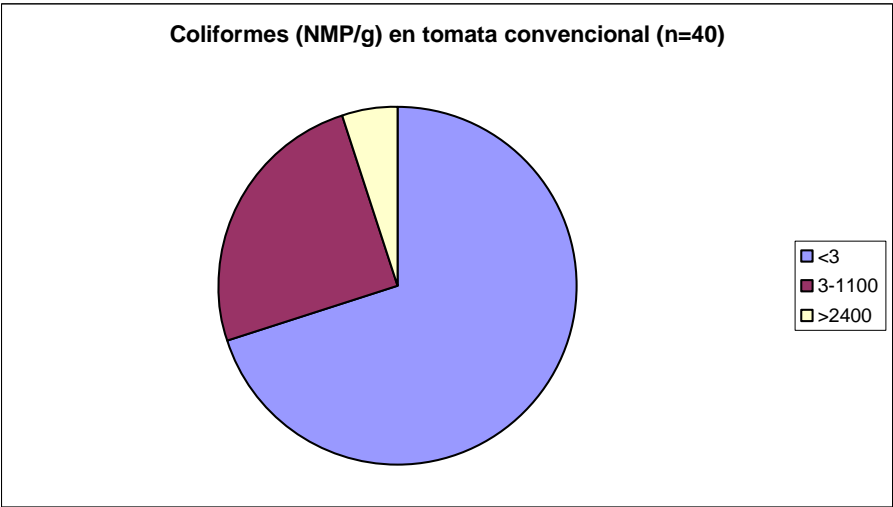
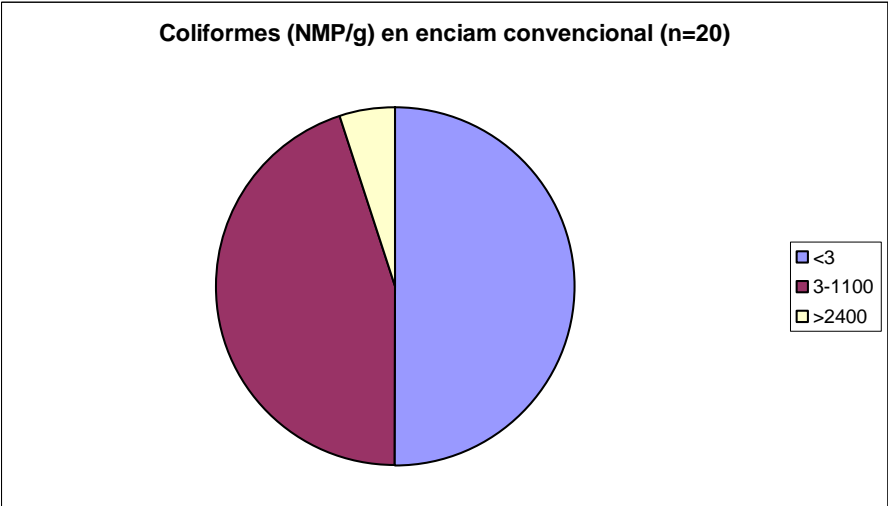


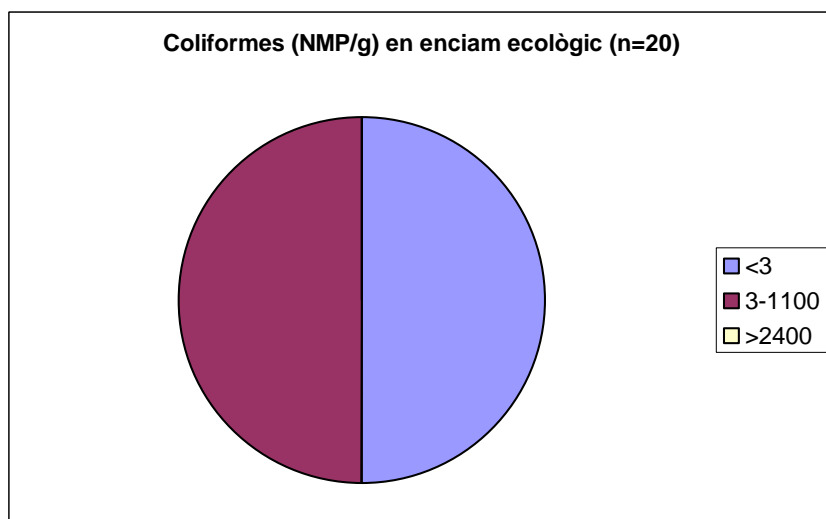
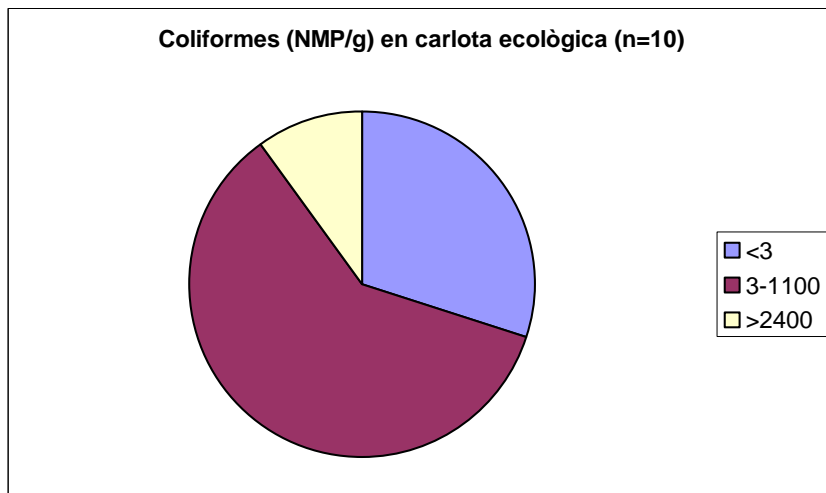
Coliformes (NMP/g) en amanides (n=30)

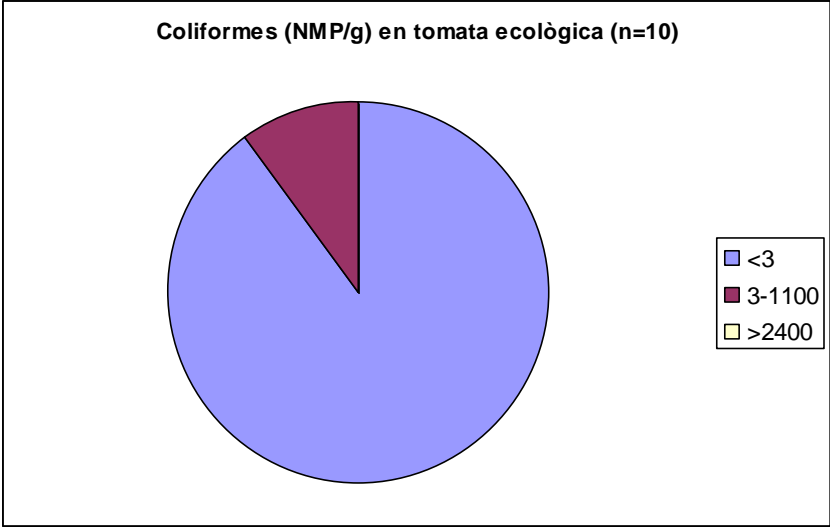
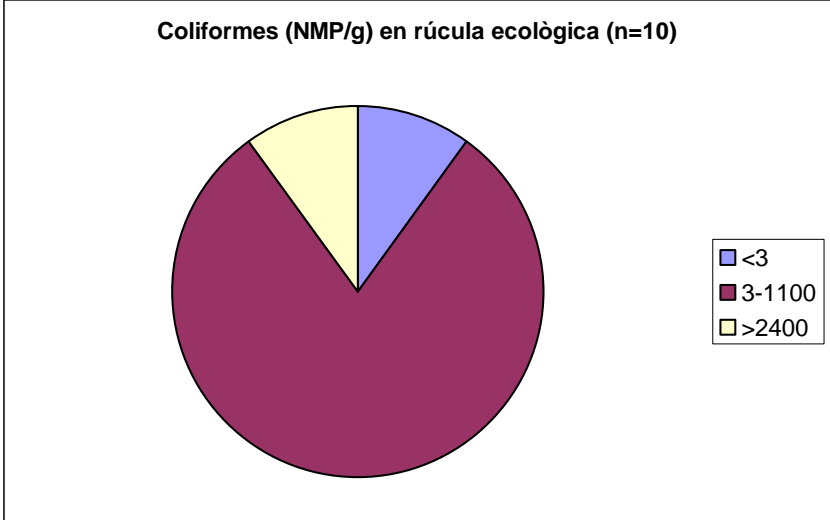


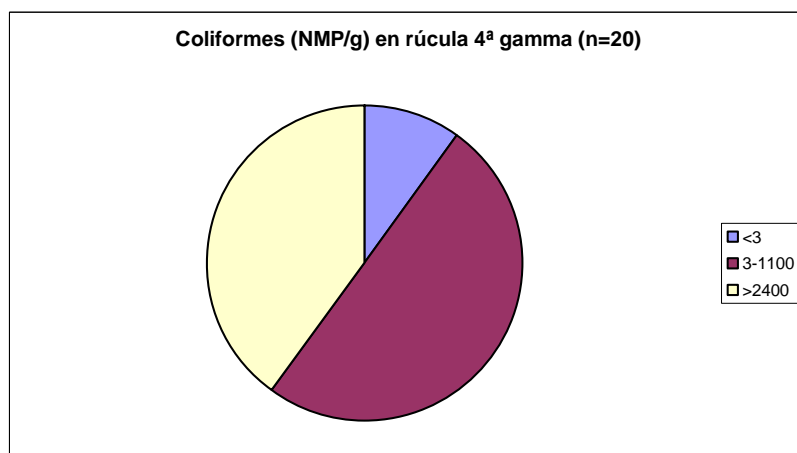
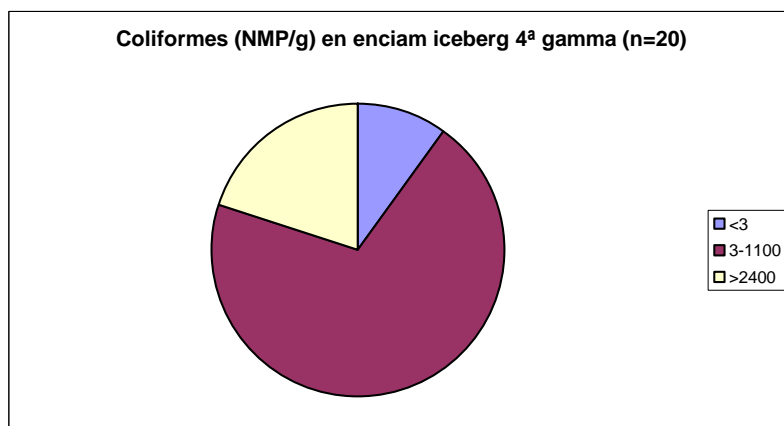
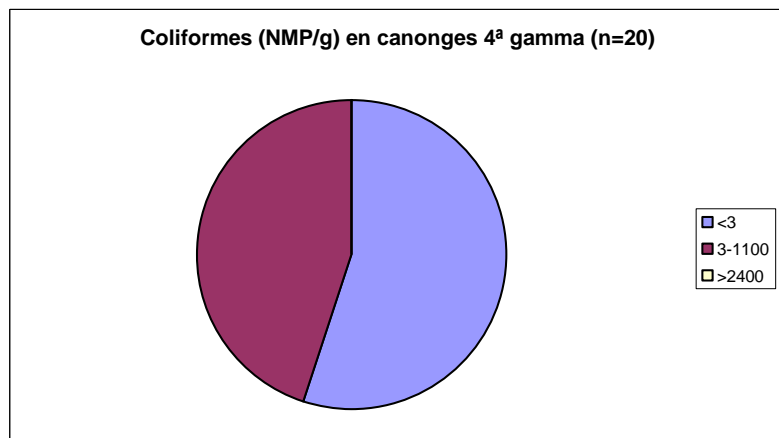






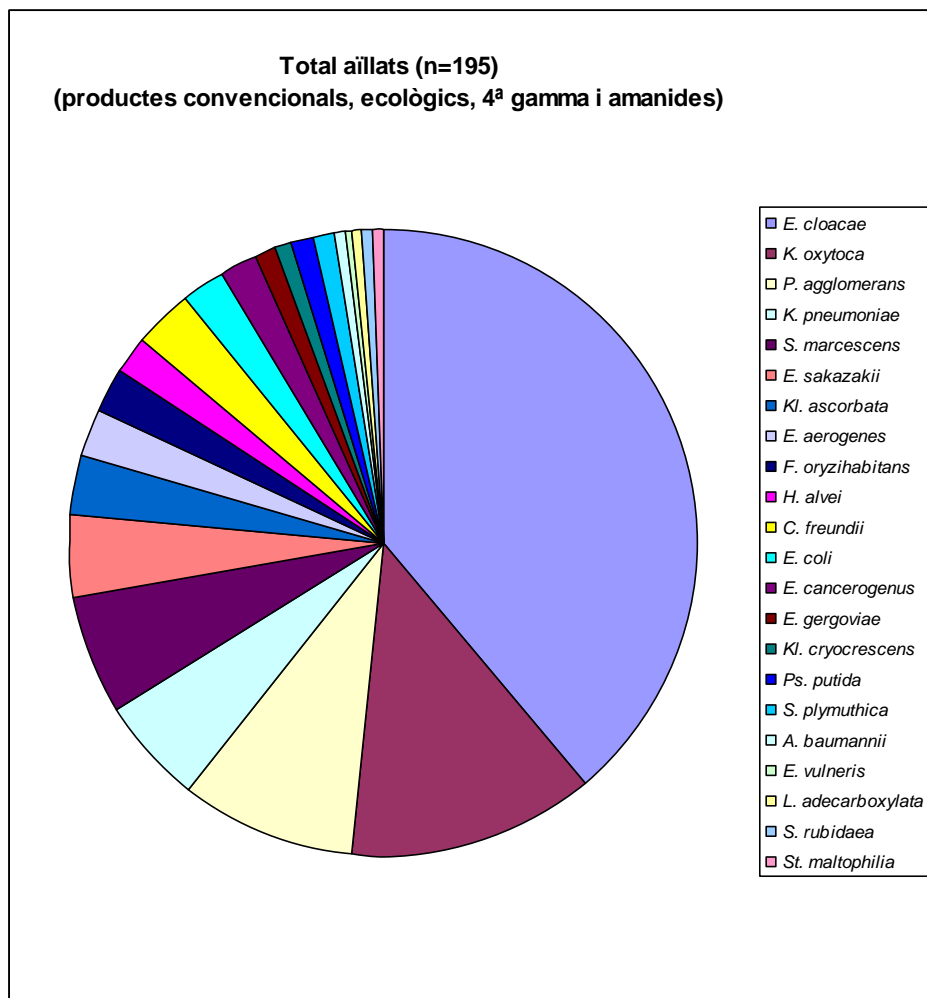


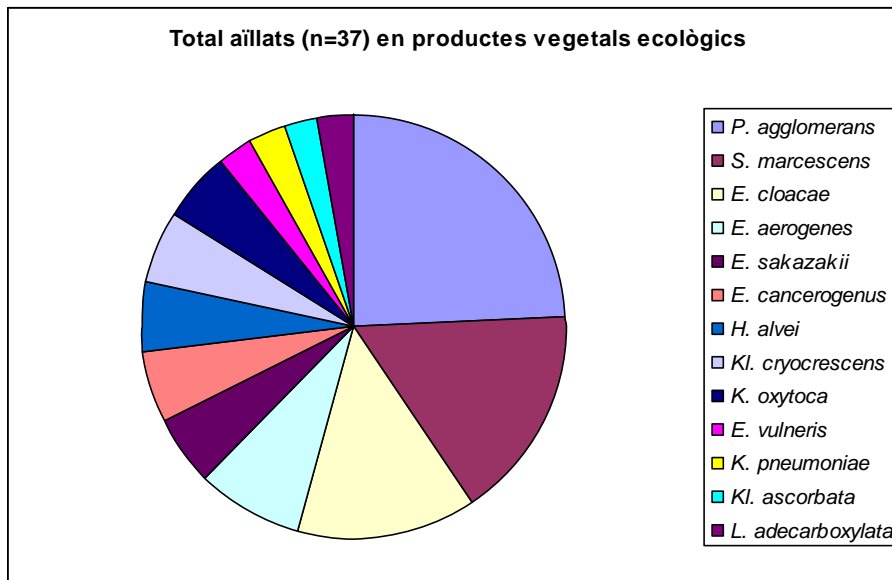
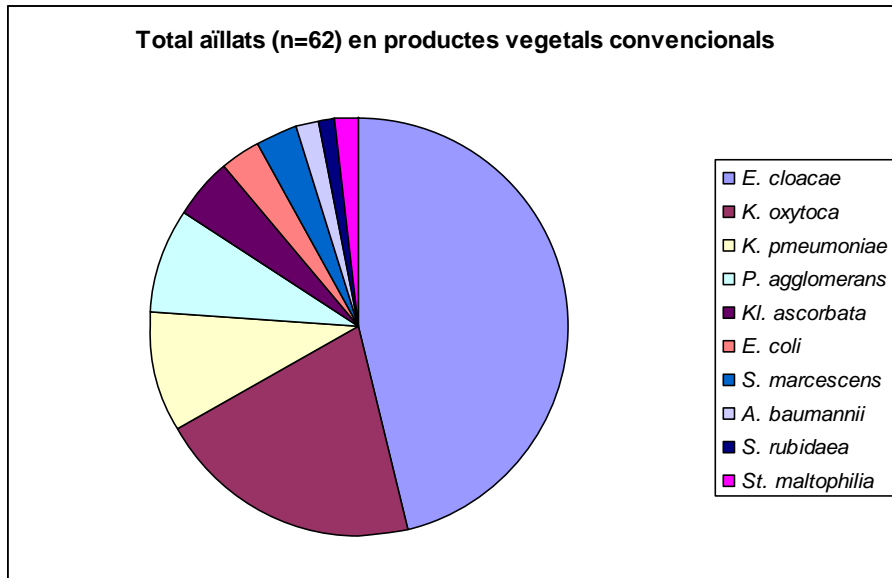


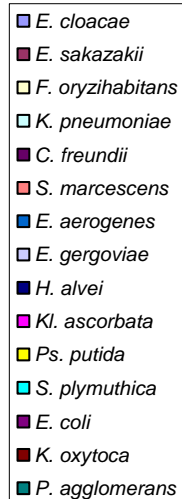
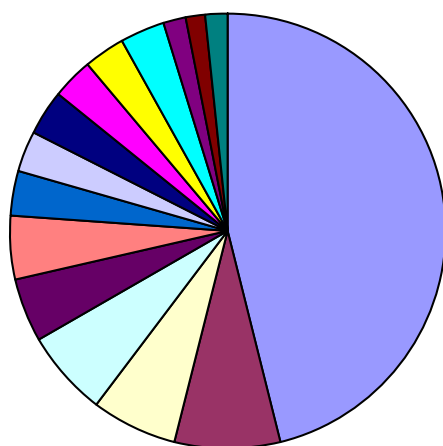


3.10. ANNEX II

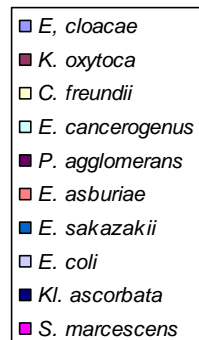
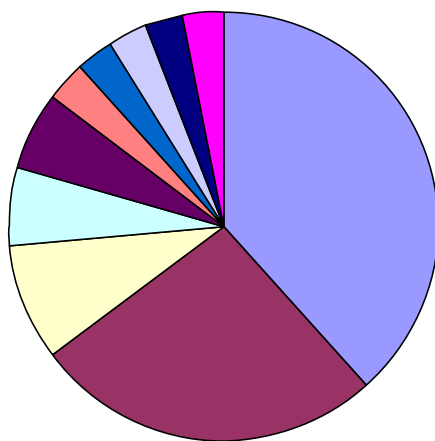
Aïllats identificats en productes vegetals frescos

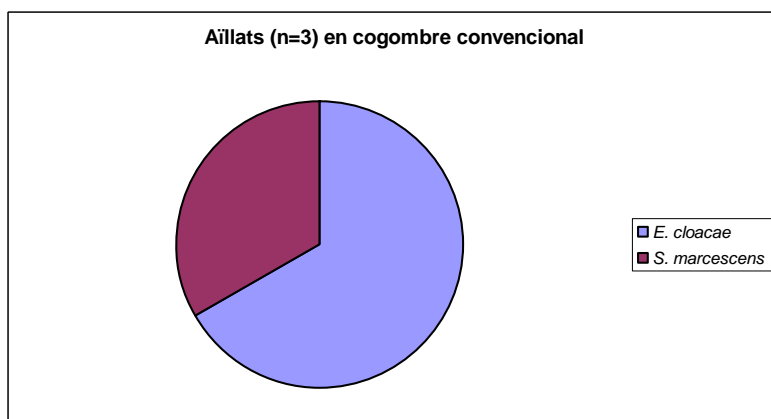




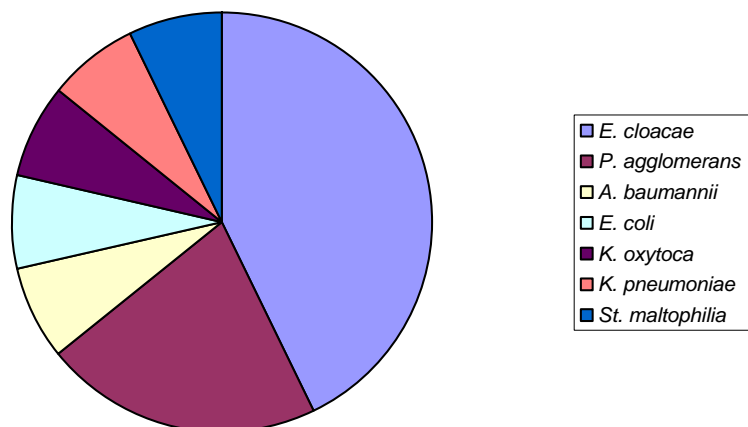
Total aïllats (n=63) en productes vegetals de 4^a gamma

Total aïllats (n=33) en amanides

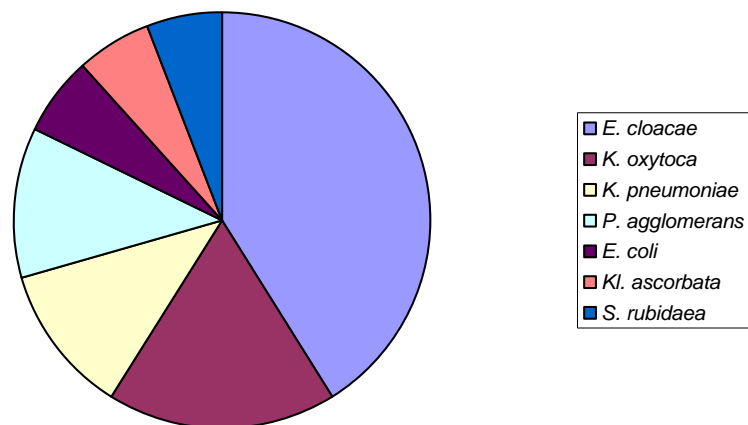


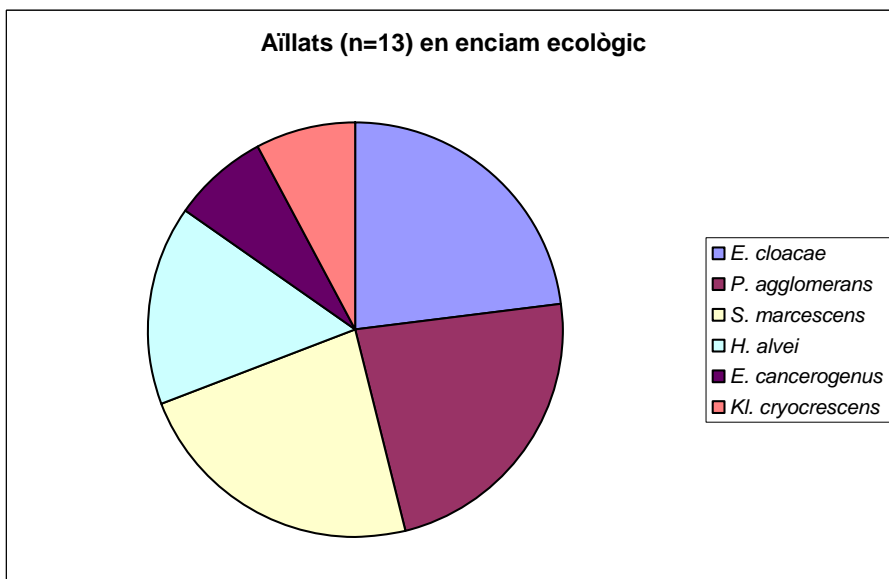
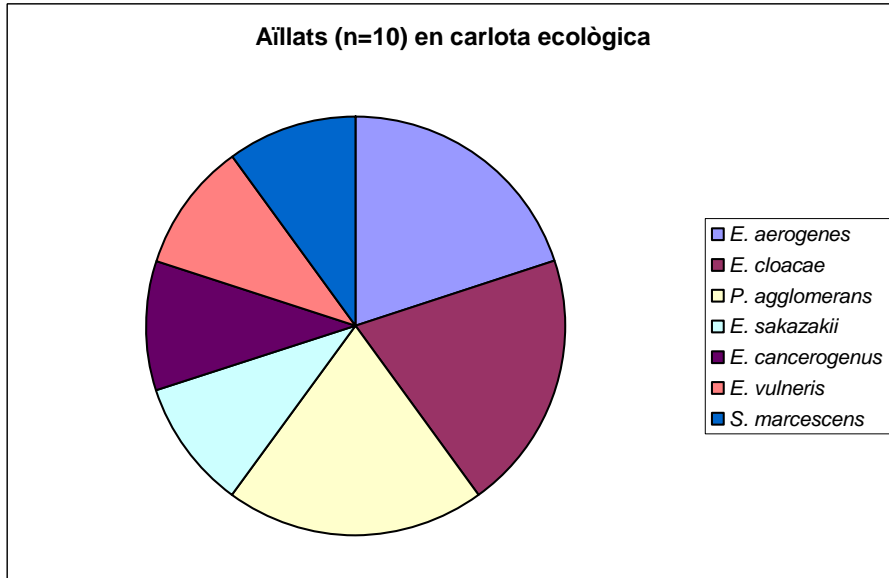


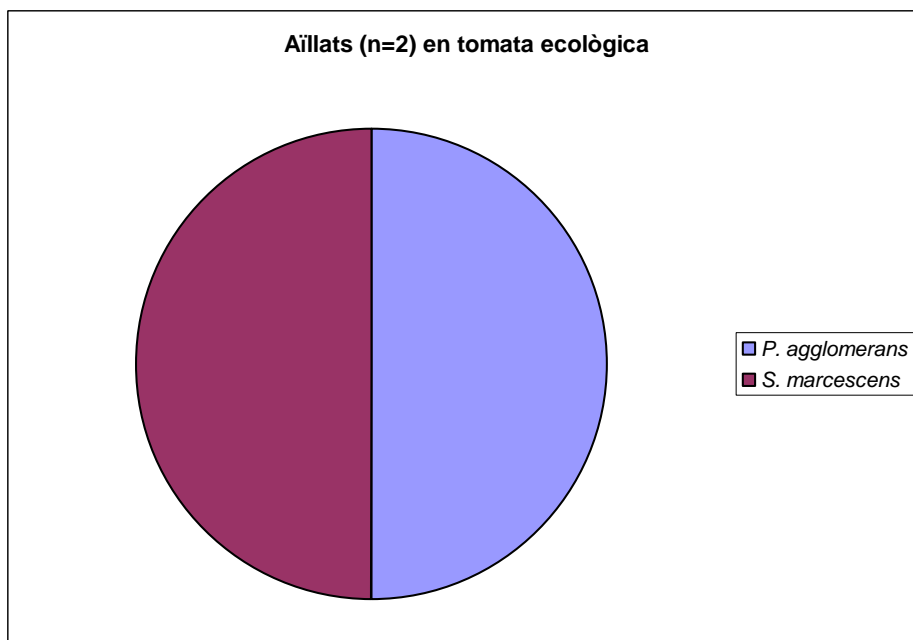
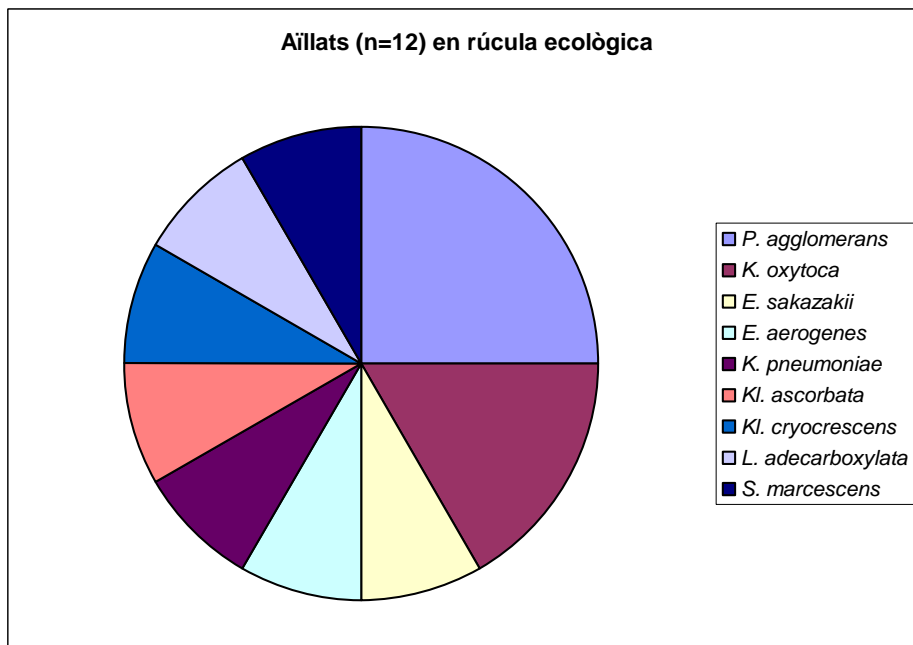
Aïllats (n=14) en enciam convencional

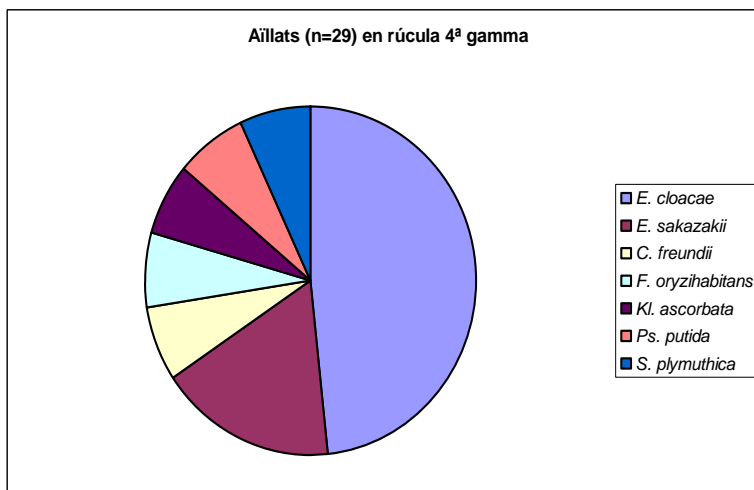
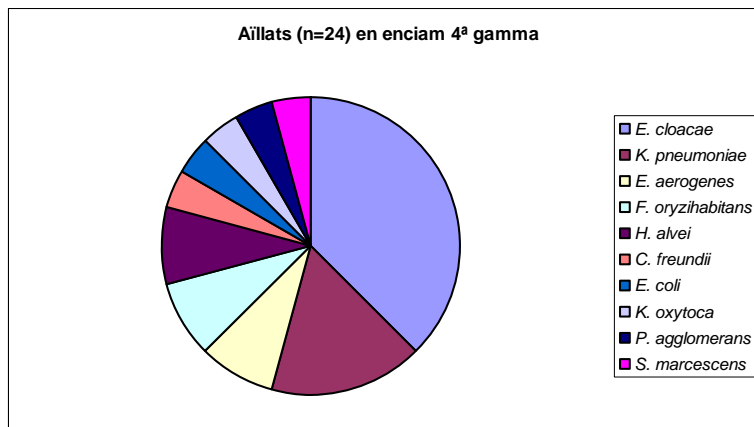
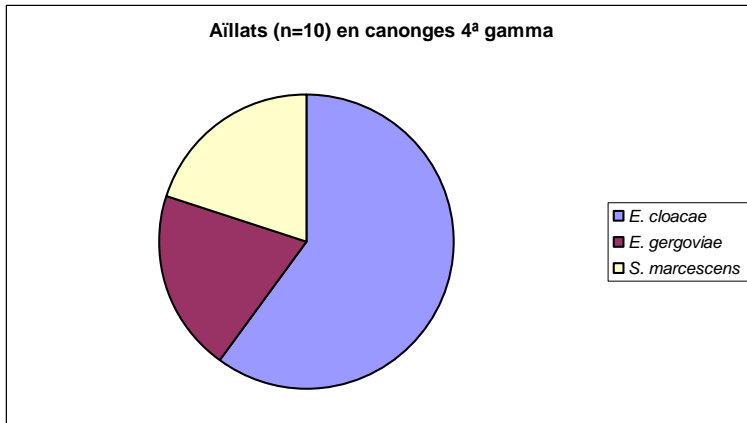


Aïllats (n=17) en tomata convencional





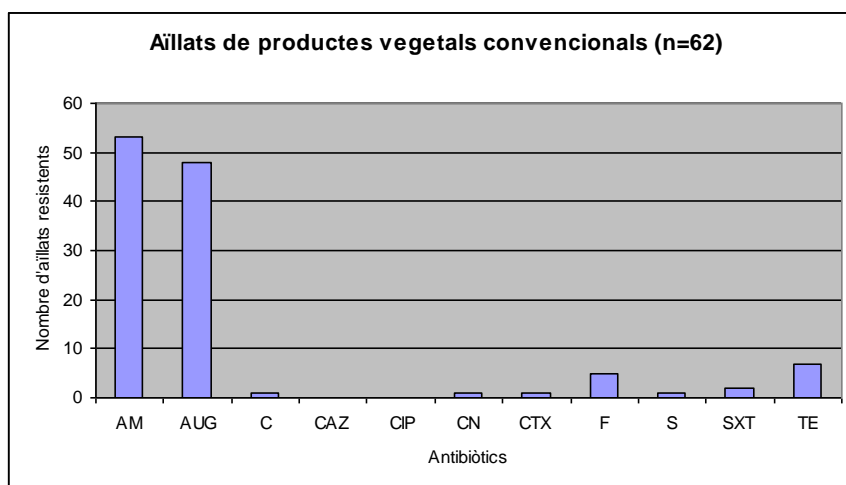
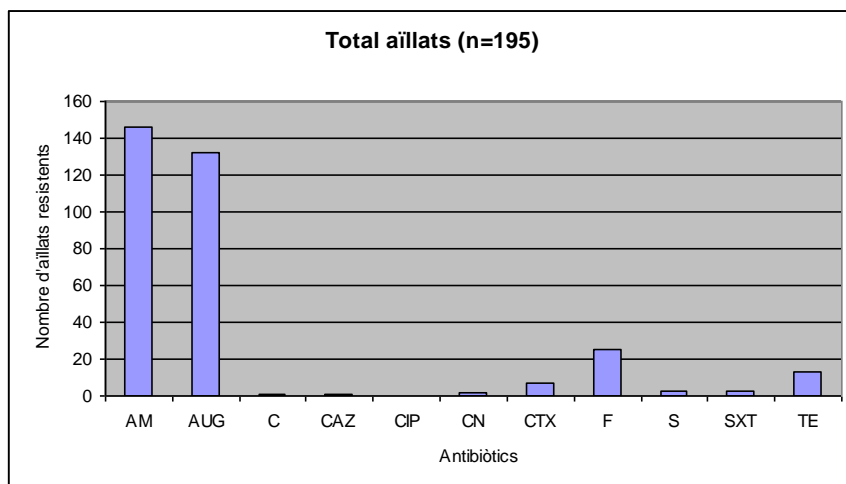


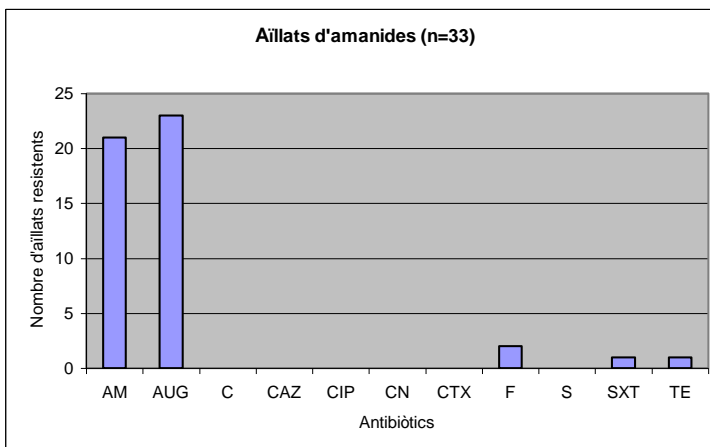
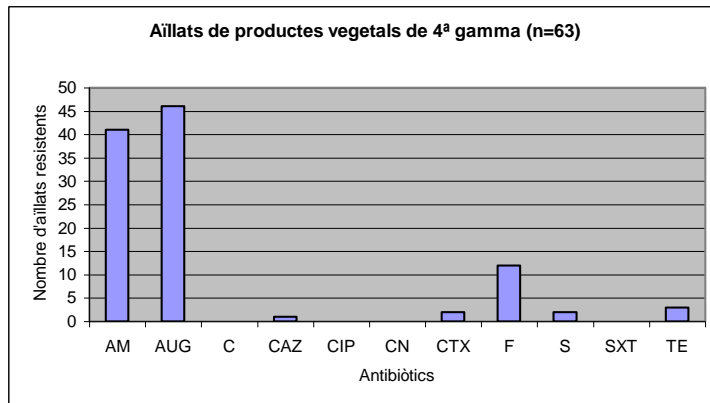
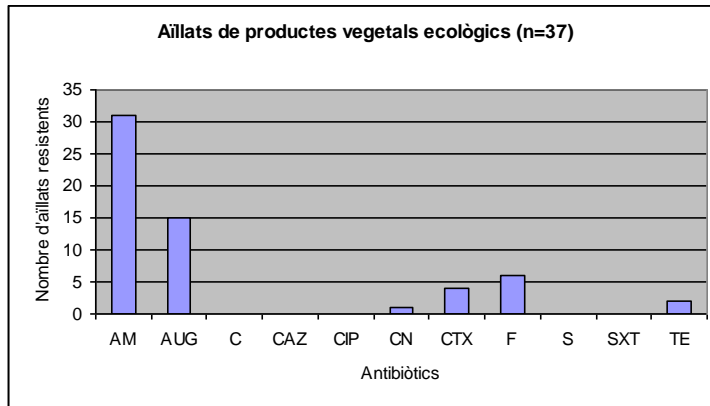


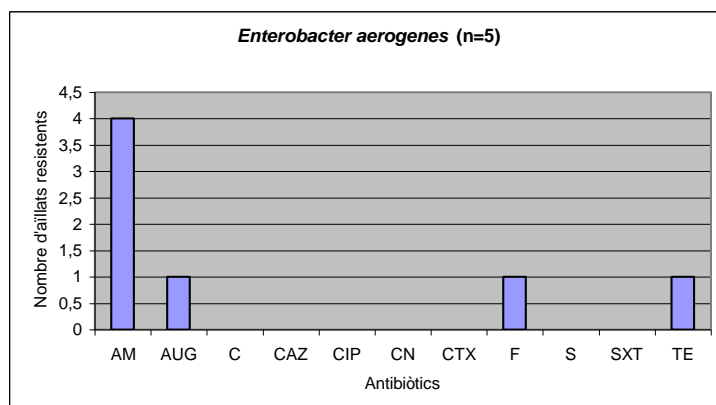
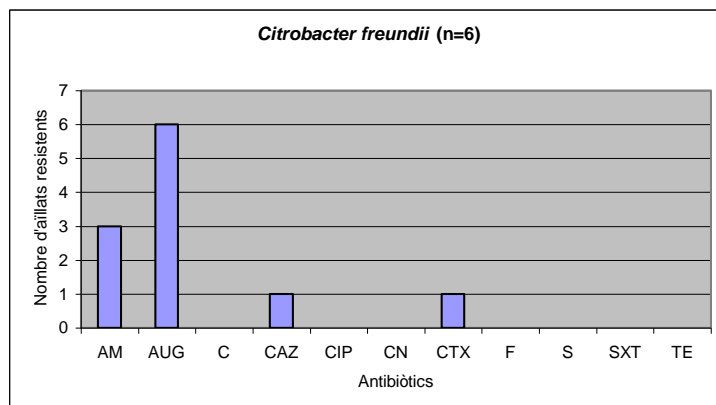
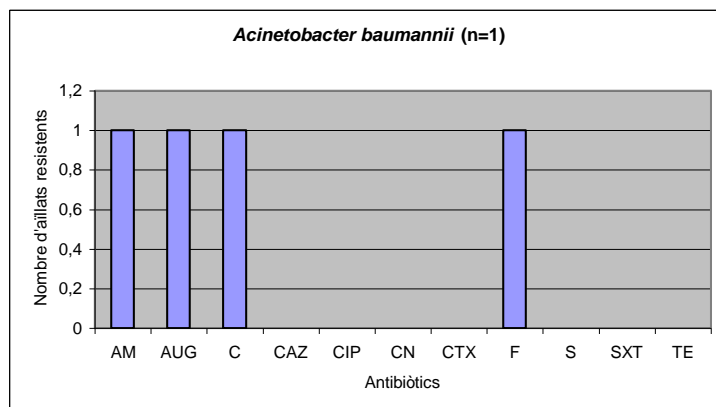
3.11. ANNEX III

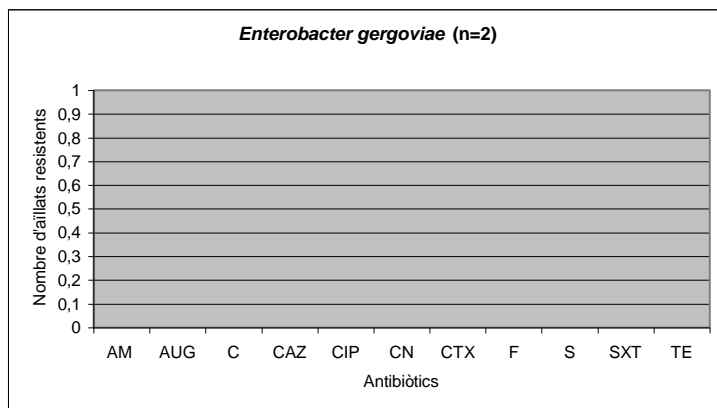
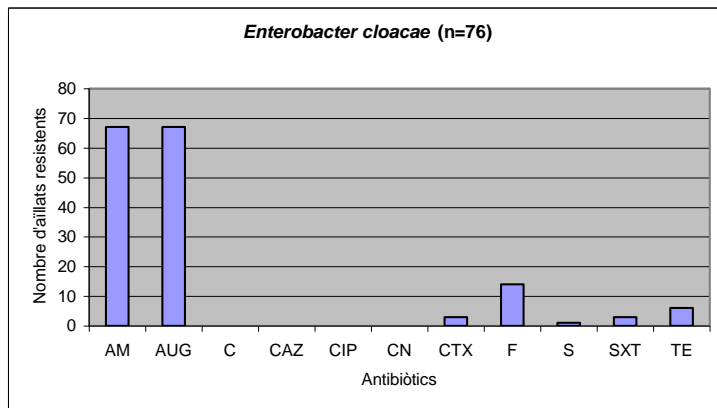
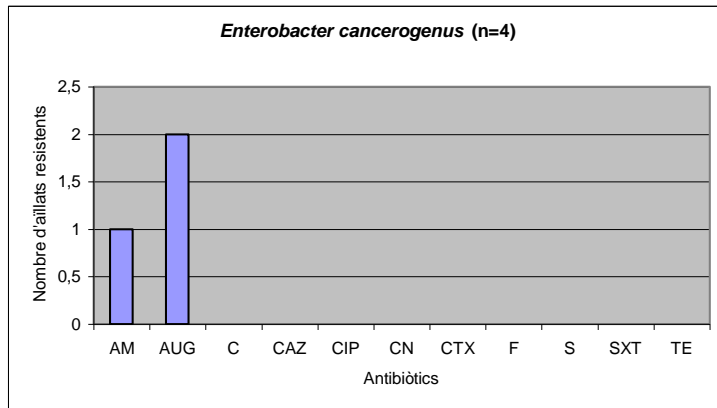
Resistències als antibiòtics en els aïllats del productes vegetals frescos

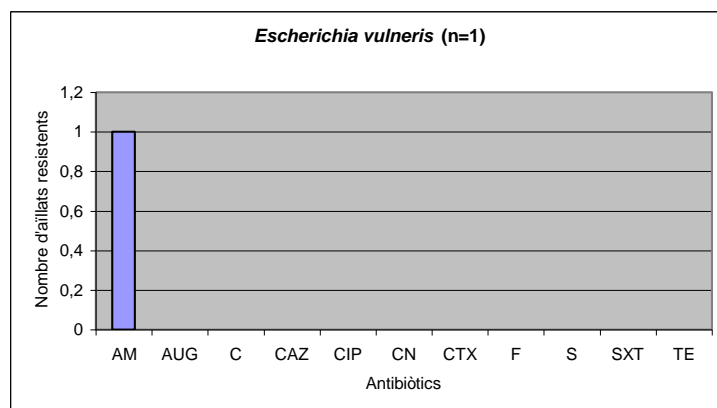
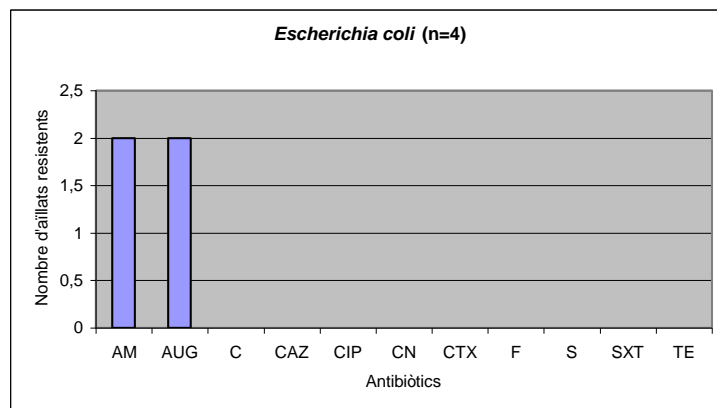
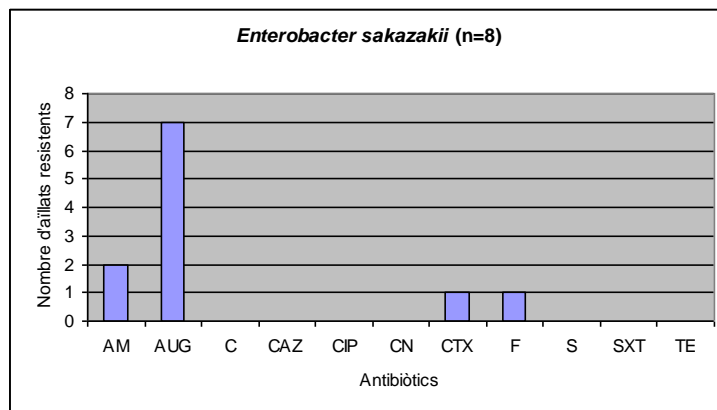
<i>ABREVIATURA</i>	<i>ANTIBIÒTIC</i>
AM	Ampicil·lina
AUG	Augmentine (Amoxicil·lina/clavulànic)
C	Cloramfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CN	Gentamicina
CTX	Cefotaxima
F	Nitrofurantoïna
S	Estreptomicina
SXT	Cotrimoxazol (Sulfametoxazol/trimetoprim)
TE	Tetraciclina

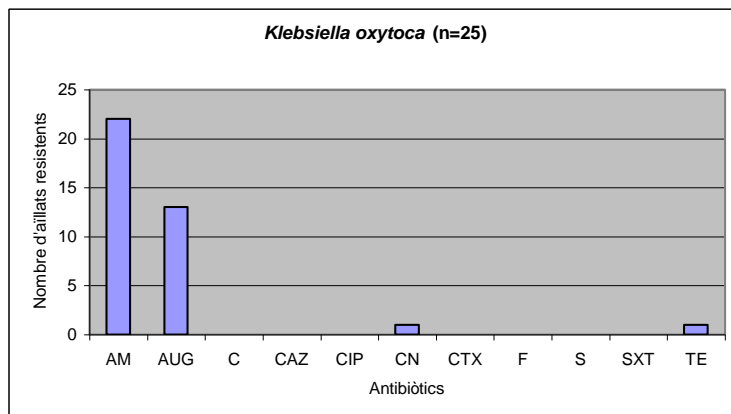
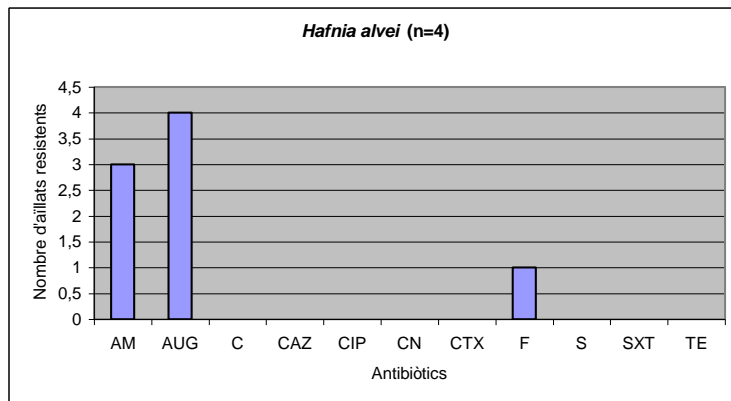
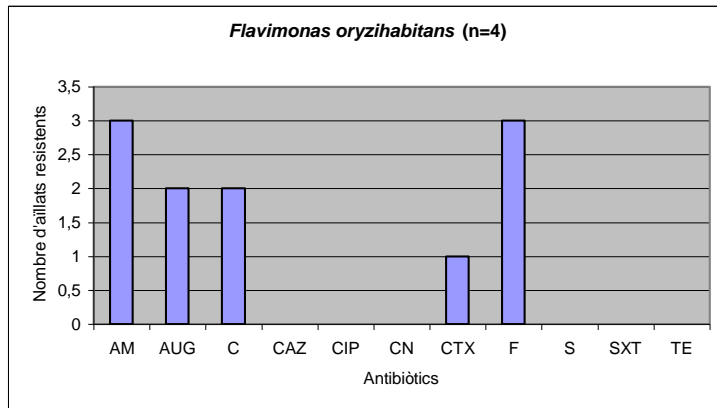


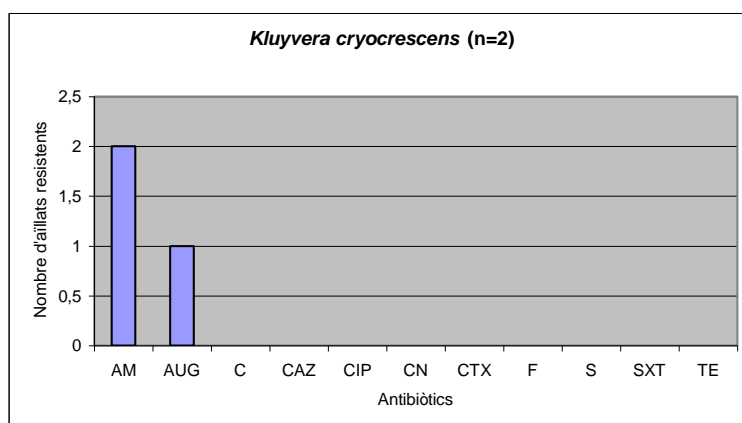
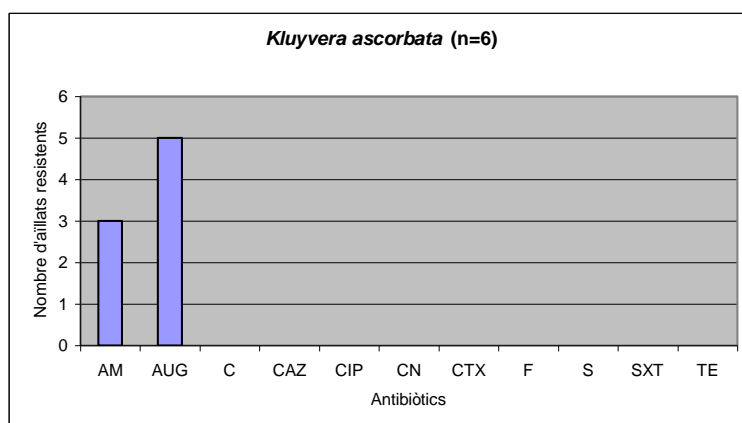
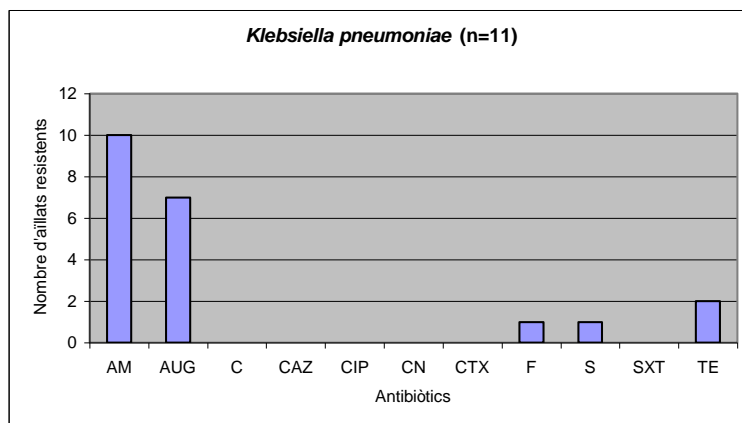


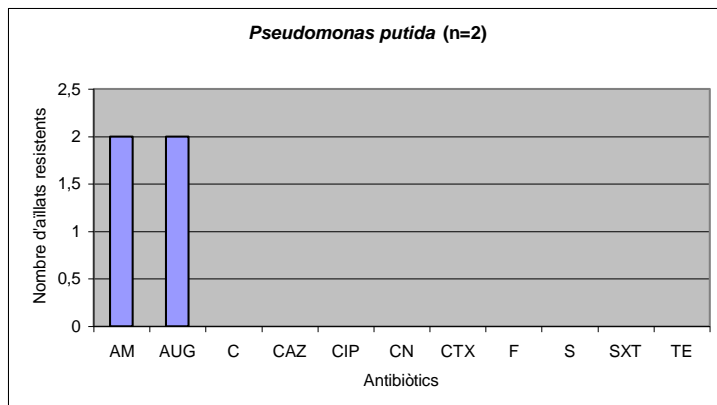
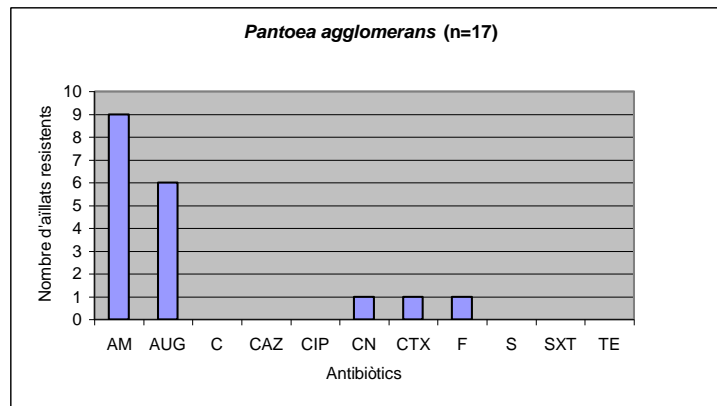
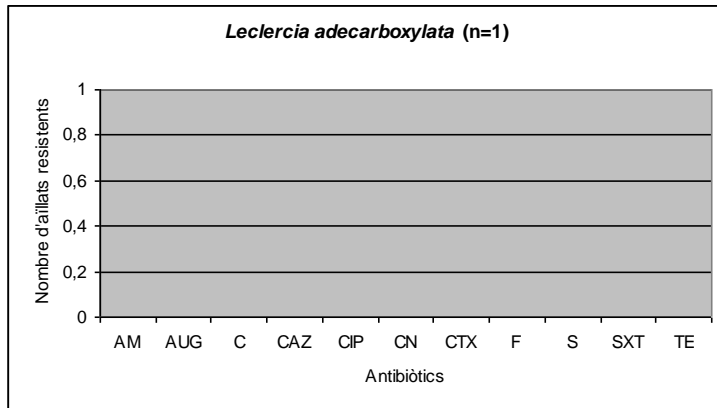


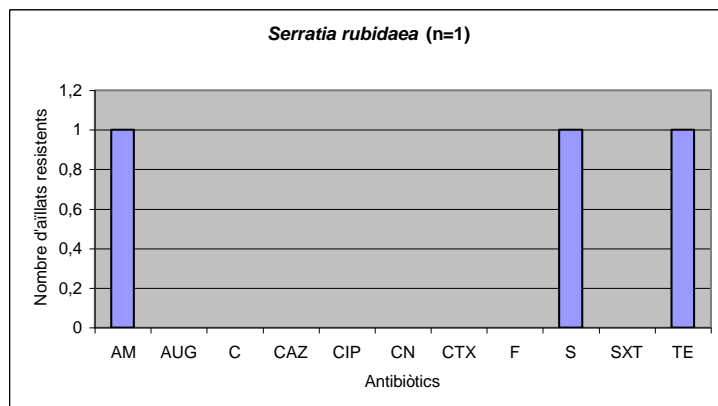
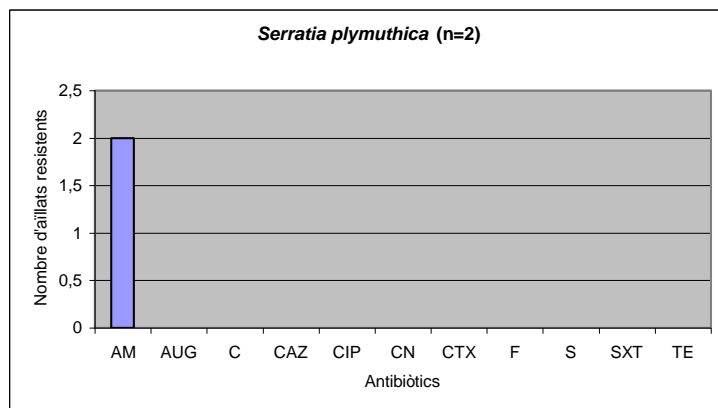
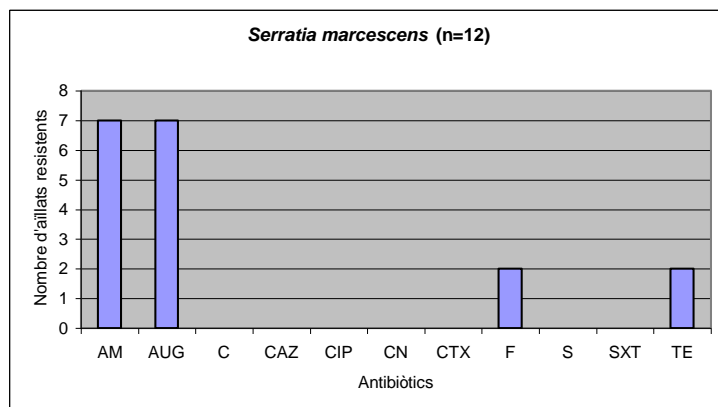


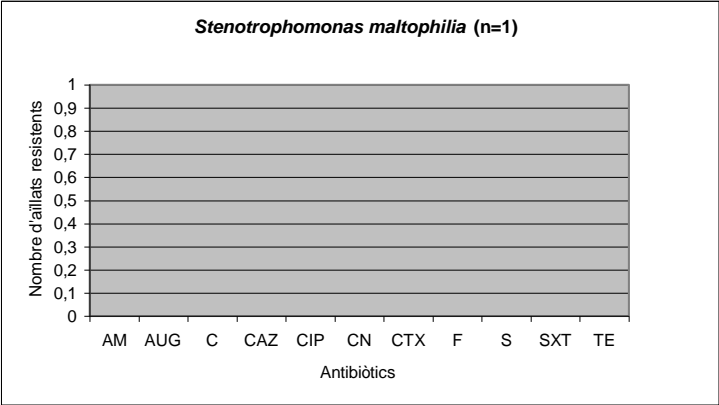






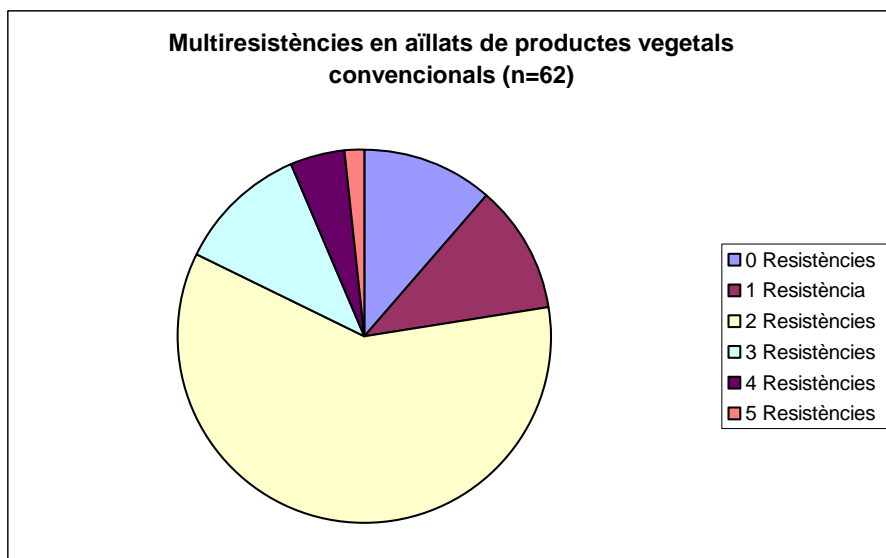
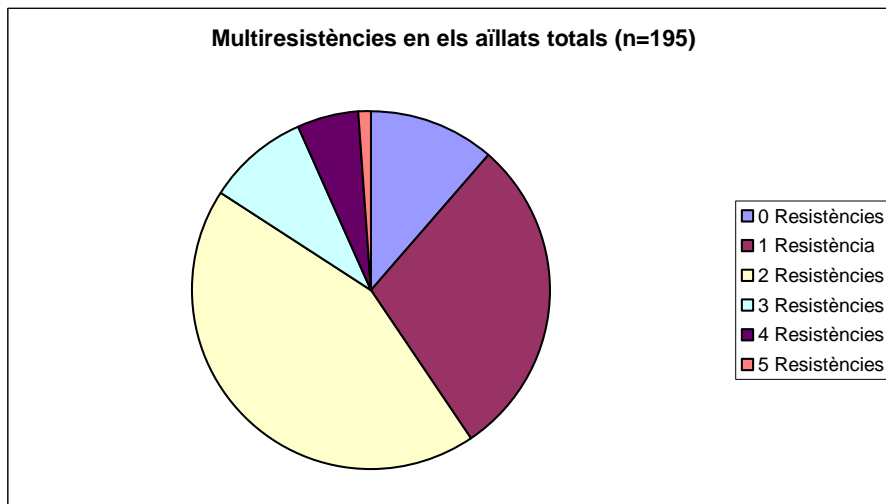


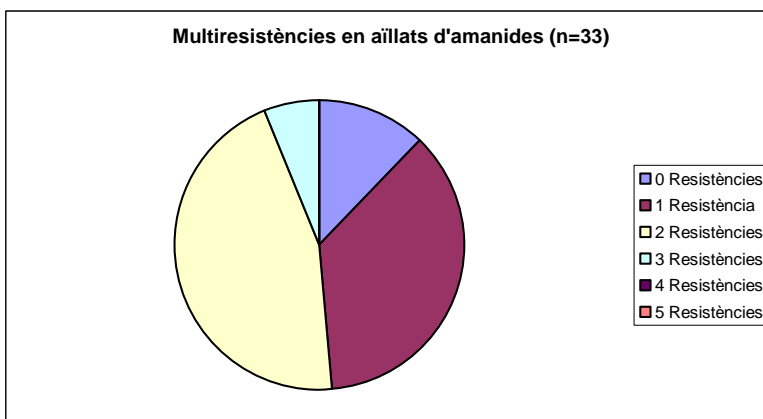
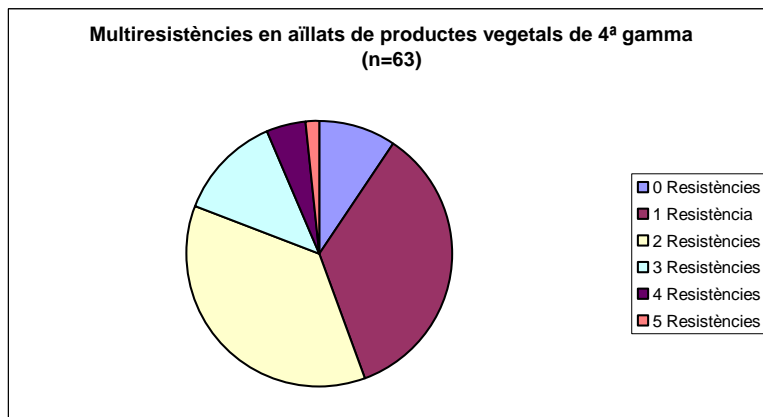
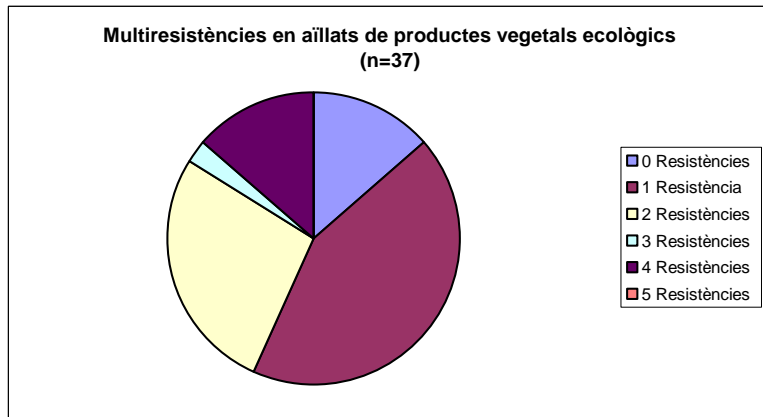


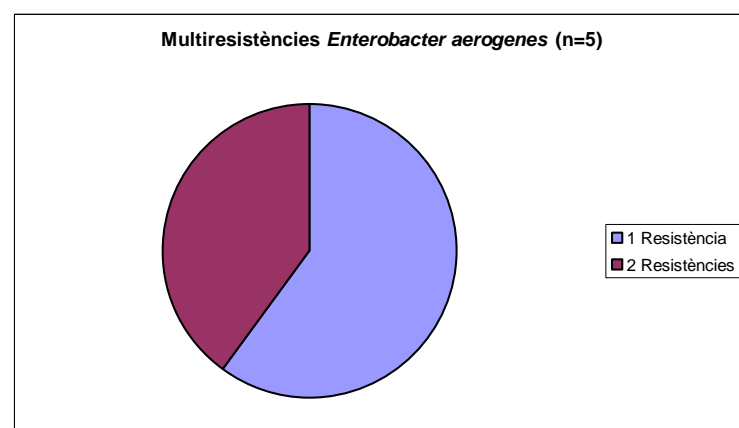
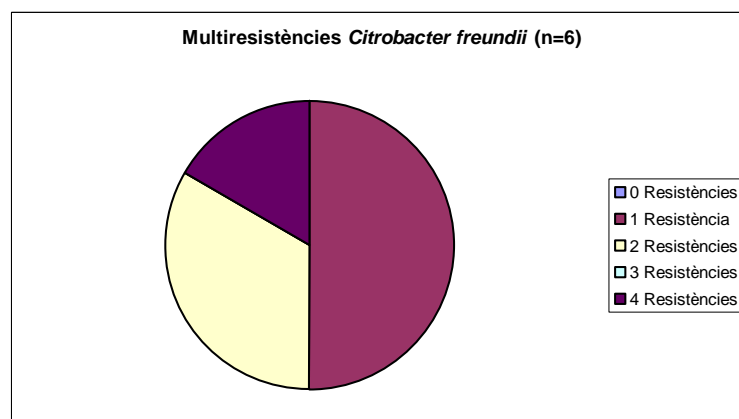
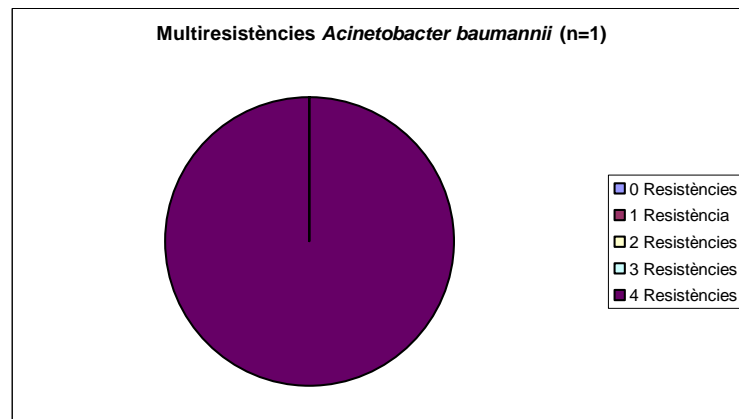


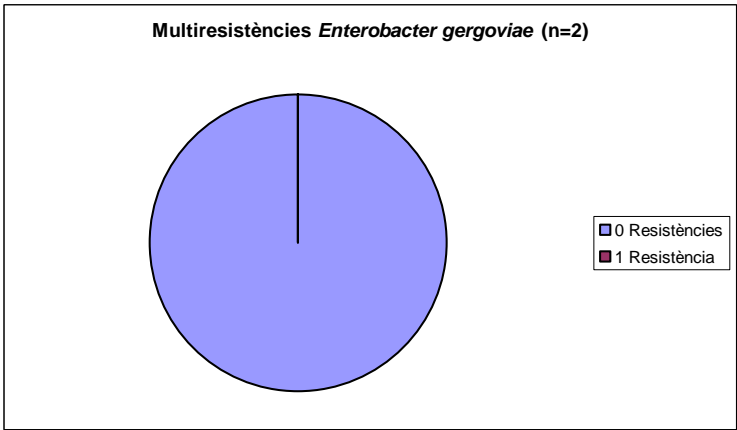
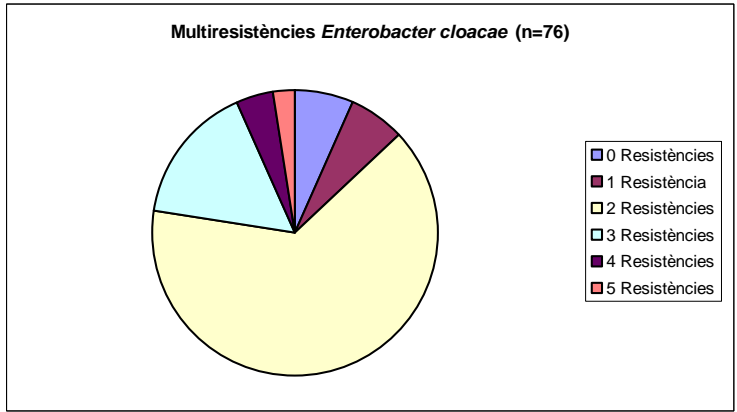
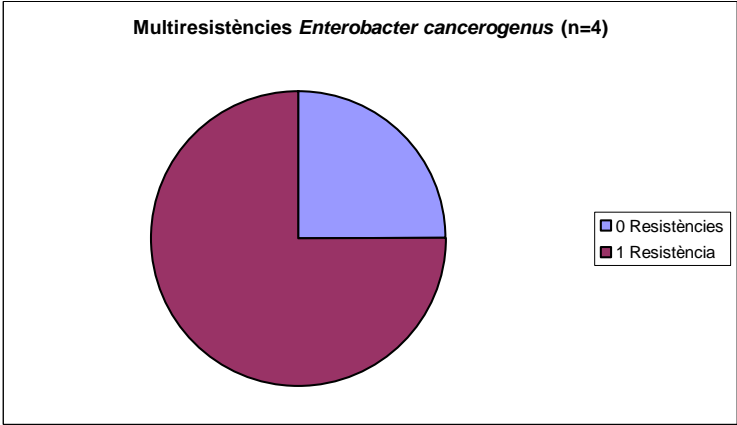
3.12. ANNEX IV

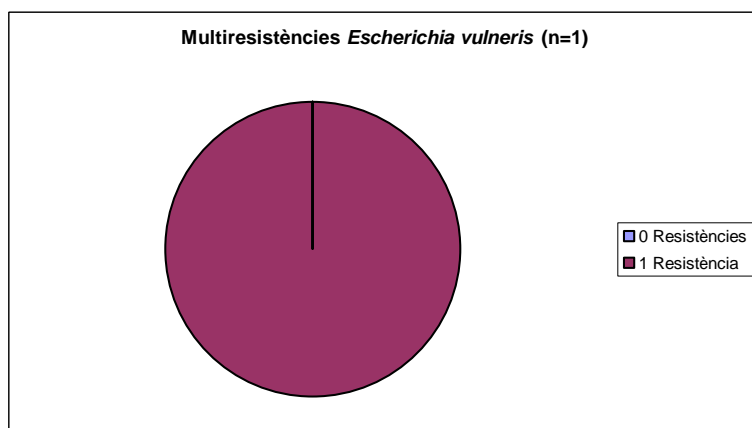
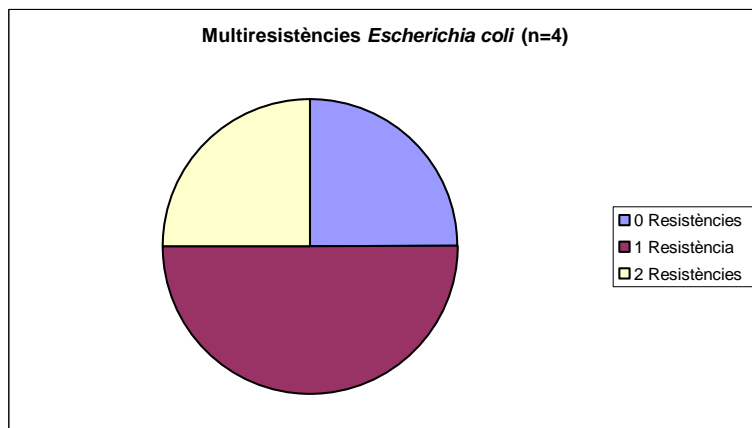
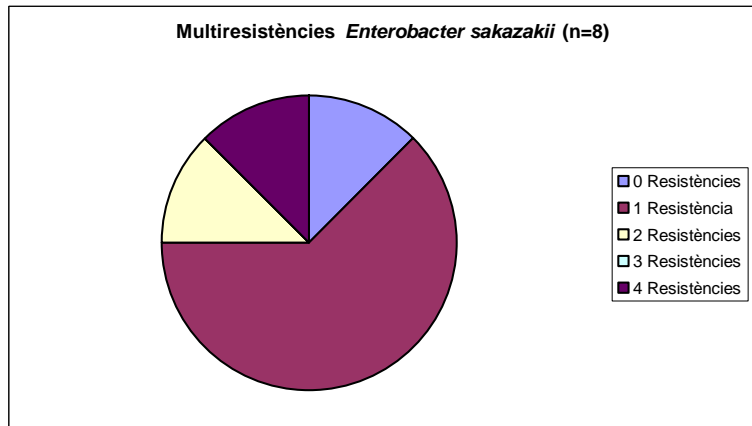
Multiresistències als antibiòtics en els aïllats dels productes vegetals frescos

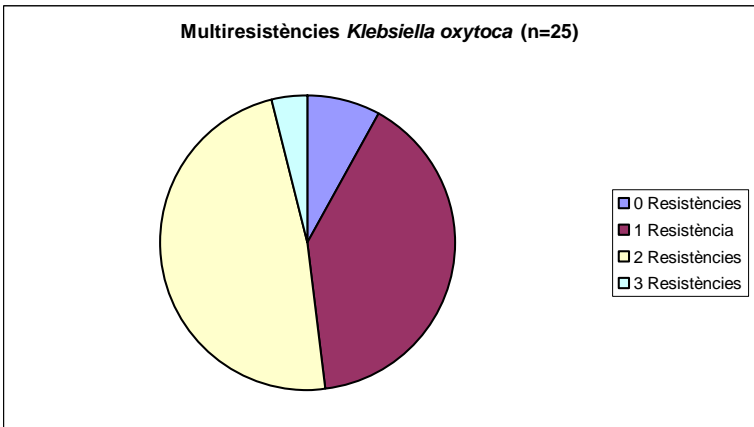
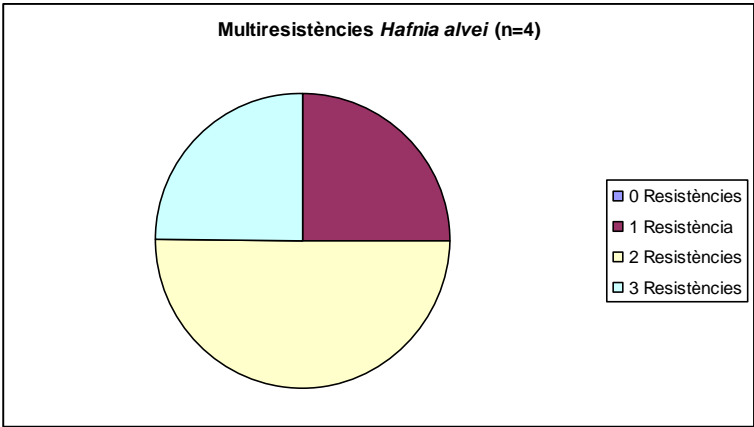
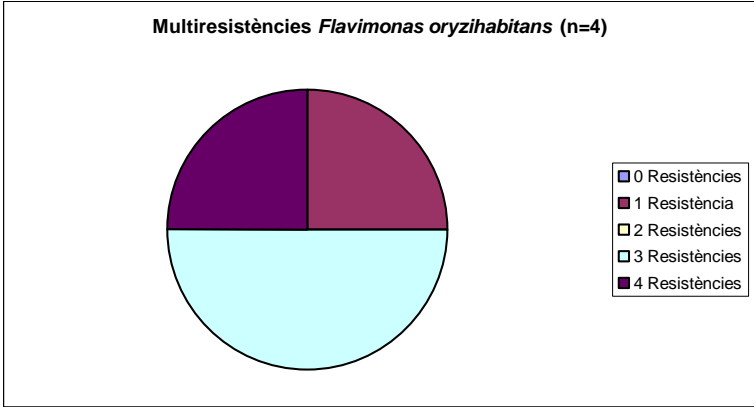


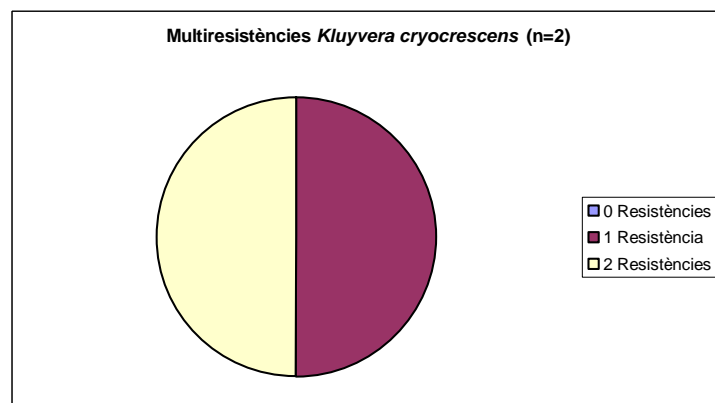
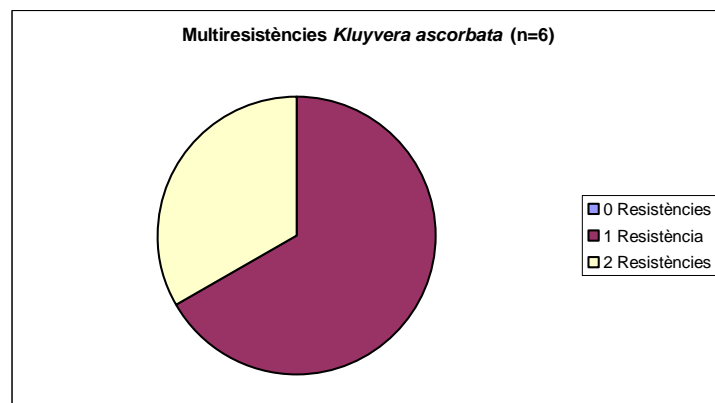
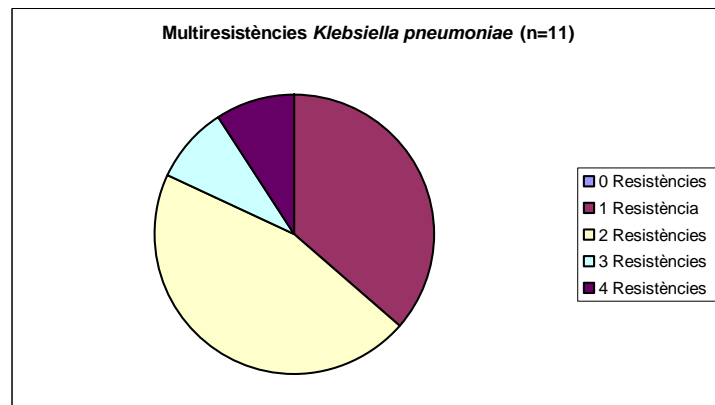


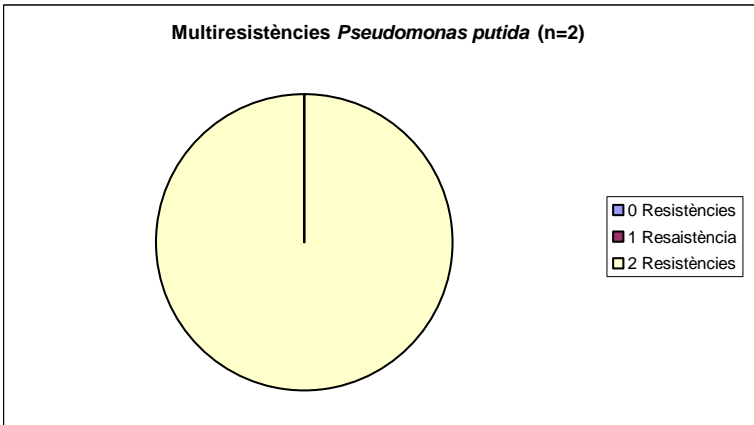
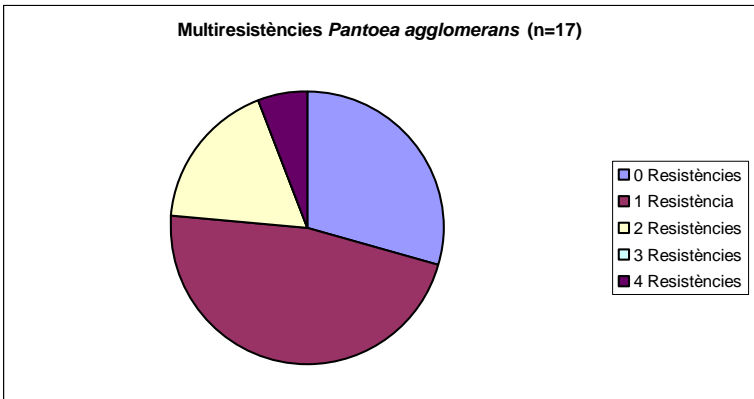
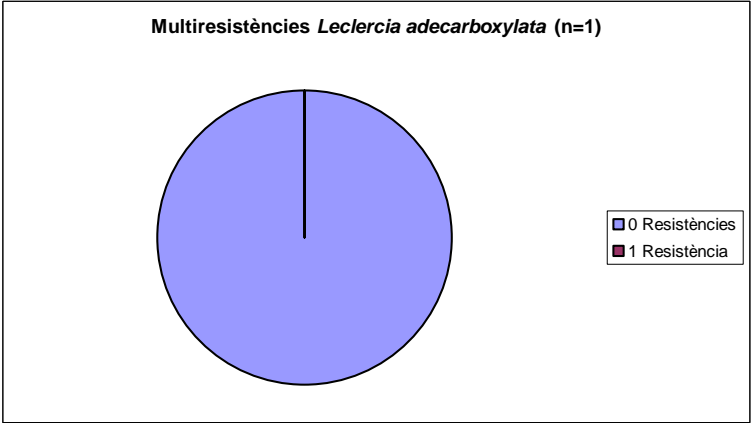


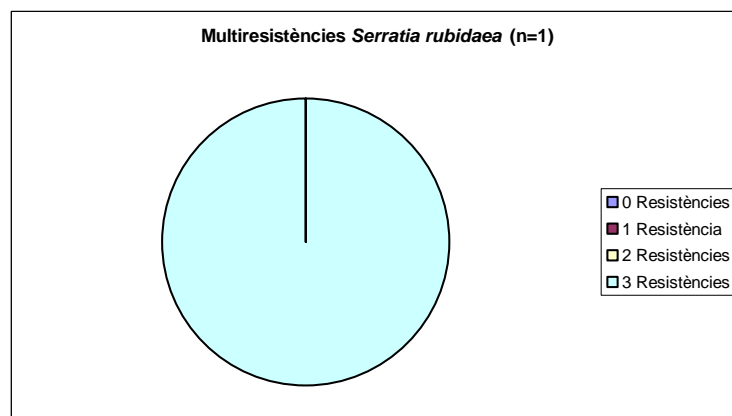
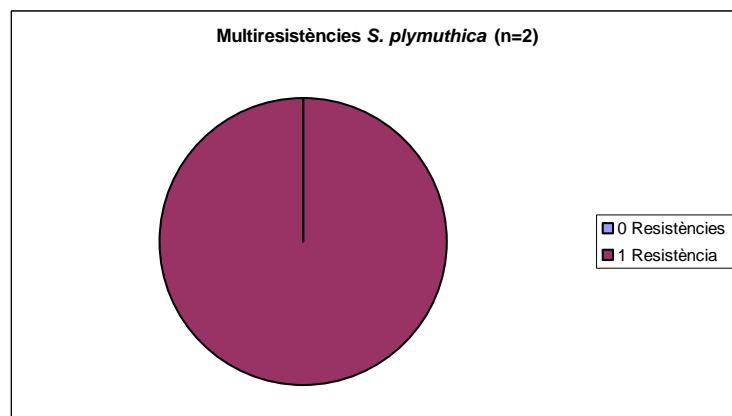
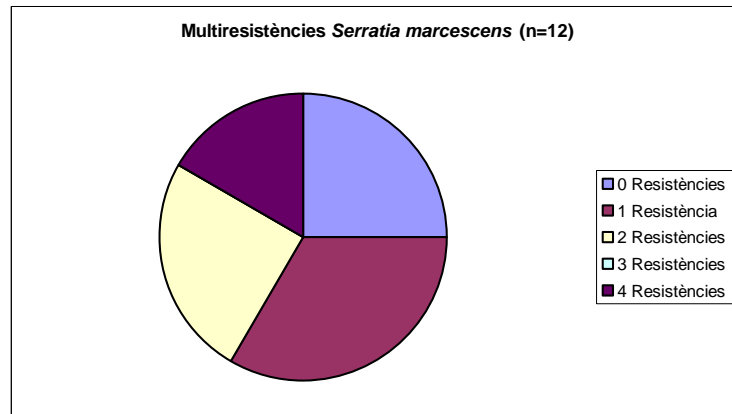


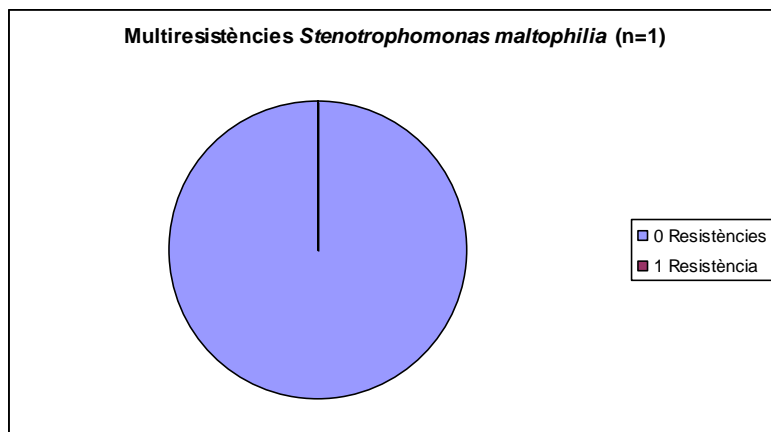












4. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. ENTEROBACTERIS EN PRODUCTES VEGETALS FRESCOS

En aquest treball s'ha estudiat la presència d'enterobacteris en productes vegetals frescos que poden consumir-se directament, sense tractaments que poden afectar a la viabilitat dels microorganismes presents en aquests vegetals. Com material d'estudi s'han seleccionat una sèrie de verdures i hortalisses que habitualment poden consumir-se crues (tomates, enciams, rúcula, canonges, etc.), adquirides en distints establiments de la ciutat de València i els seus voltants, ja que la zona de l'horta de València es caracteritza, a més de per la qualitat i quantitat de la producció hortícola, per l'ús de pràctiques agrícoles (com l'ús de fem com adob) que afavoreixen la contaminació dels vegetals amb bacteris d'origen animal. Hi ha que indicar també que l'estudi s'ha realitzat tant amb verdures i hortalisses cultivades de manera estàndard o convencional (no ecològica), com amb productes ecològics o orgànics i també amb vegetals processats (rentats, tallats i envasats) llestos per consumir directament pel consumidor (quarta gamma). S'han analitzat un total de 230 mostres de distints grups de vegetals: (i) 90 mostres de productes vegetals frescos cultivats mitjançant tècniques habituals (estàndard o convencional), (ii) 50 mostres de vegetals orgànics cultivats mitjançant mètodes ecològics, (iii) 60 mostres de productes vegetals de quarta gamma (tallats, processats, empaquetats i comercialitzats llestos pel consum), i (iv) 30 mostres d'amanides preparades en cuina, amb distints ingredients, i servides al consumidor.

Els distints vegetals analitzats van ser: tomates de diferents tipus (pera i rodona convencional i ecològica) (50 mostres), enciams de diferents tipus (romana, iceberg, ecològic romana, i fulles roges i iceberg de quarta gamma) (60 mostres), cogollos (10 mostres), rúcula (quarta gamma i ecològica) (30 mostres), carlota (estàndard i ecològica) (20 mostres), canonges (quarta gamma) (20 mostres), i cogombre (estàndard) (10 mostres). Les mostres van ser adquirides en distints establiments de la ciutat de València i els voltants, tant en supermercats, fruiteries, i tendes especialitzades en productes ecològics. Les mostres d'amanida es van obtenir de menjadors escolars de dos centres educatius (20 mostres) i d'establiments de menjar per emportar (10 mostres).

Totes les mostres vegetals es van recollir en les bosses subministrades pels establiments comercials, tal com ho fan habitualment els consumidors, excepte les mostres d'amanides, que van ser recollides en recipients estèrils. Les mostres es van transportar al laboratori pel seu anàlisi immediat, mitjançant mètodes microbiològics clàssics. En primer lloc, a partir de cada mostra vegetal individual es va obtenir una alíquota (3-5 g), en condicions asèptiques, que es va processar mecànicament durant un minut a temperatura

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

ambient per obtenir un extracte en aigua de peptona (Laboratoris Microkit, Valdemoro, Madrid), utilitzant un homogeneïtzador Stomacher (Classic IUL, Barcelona). En el cas de les amanides, la mostra analitzada va contenir una mescla dels ingredients d'aquestes. A partir d'aquests extractes, es va procedir a determinar el nombre més probable de coliformes (NMP) pel mètode estàndard (colimetria), mitjançant sembra de dilucions dels extractes en medi de cultiu líquid (caldo lactosat-biliat al verd brillant, BGBL: "Brilliant Green Bile Lactose Broth" 2%, Laboratori Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid), en el que es facilita el creixement dels bacteris coliformes, que al ser incubats a 37°C (24-48 h) són capaços de créixer fermentant la lactosa amb producció d'àcids i gasos. A partir dels cultius positius, es va procedir a aïllar els microorganismes presents mitjançant sembra en plaques amb medi selectiu EMB (agar EMB Levine, Liofilchem, Itàlia). Les colònies aïllades després de la incubació a 37°C durant 24-48 h, es van identificar mitjançant mètodes microbiològics habituals: tinció de Gram, proves de l'oxidasa (tires de detecció de l'oxidasa, Biofix, Düren, Alemanya), indol (creixement en aigua de peptona i addició del reactiu de Kovac's), i sembra en dispositius miniaturitzats comercials per determinar 30 proves bioquímiques, que permeten una fàcil lectura i la identificació a nivell d'espècie mitjançant un mètode numèric (galeries "BBL Cristall E/NF" Benex Limited, County Clare, Irlanda). Totes les mostres van ser identificades amb un nivell de fiabilitat superior al 95% (dada subministrada per el programa informàtic utilitzat per la identificació de les espècies a partir del codi numèric que es va obtenir en cada cas). Aquesta metodologia permet l'aïllament de bacteris coliformes (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Citrobacter*) i d'altres espècies d'enterobacteris no coliformes (*Hafnia*, *Pantoea*, *Serratia*, *Kluyvera*, *Leclercia*, etc.) i d'altres bacteris Gram-negatius que no pertanyen als enterobacteris (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavimonas*, *Stenotrophomonas*, etc.) que encara que no produeixen gasos a partir de la lactosa o no l'utilitzen, creixen bé en caldo lactosat.

Els resultats que es van obtenir en quant al NMP de coliformes en les mostres analitzades indiquen que aproximadament un 60% de totes les mostres estan contaminades amb bacteris coliformes, sent aquest percentatge qualitatiu major en les amanides (90%) i els productes de quarta gamma (75% de mostres contaminades), seguit dels productes ecològics (54%) i dels productes vegetals estàndard (42%). Les mostres que van mostrar un major contingut o càrrega de coliformes (superior a 2.400 per gram) van ser també les amanides (27%) i els productes de quarta gamma (20%), seguits dels productes estàndard (12%) i dels ecològics (4%), sent la mitjà total del 14% (Taula 4.1 i Annex I)

Taula 4.1. NMP coliformes/g en els distints grups de mostres vegetals analitzades.

NMP	Estàndard (n: 90)	Quarta gamma (n: 60)	Ecològics (n: 50)	Amanides (n: 30)	Total (n: 230)
<3	52 (57,7%)	15 (25%)	23 (46%)	3 (10%)	93 (40,4%)
3-1100	27 (30%)	33 (55%)	25 (50%)	19 (63,3%)	104 (45,2%)
>2400	11 (12,2%)	12 (20%)	2 (4%)	8 (26,6%)	33 (14,3%)

En quant a les espècies identificades (195 aïllats totals), la major part correspon a bacteris coliformes (gèneres *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* i *Klebsiella*), amb un total de 142 aïllats (73%), mentre que la resta són altres espècies d'enterobacteris (*Pantoea*, *Serratia*, *Kluyvera*, *Hafnia* i *Leclercia*) amb 45 aïllats (23%), i també es van identificar algunes espècies Gram-negatives que no pertanyen a la família dels enterobacteris (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Flavimonas* i *Acinetobacter*) (8 aïllats, 4%). Els percentatges d'aïllats que pertanyen a aquests grups (coliformes, altres enterobacteris, i altres Gram-negatius no enterobacteris) van ser similars en les mostres vegetals estàndard (80,6%, 16,1% i 3,2%, respectivament, amb un total de 62 aïllats), vegetals de quarta gamma (74,6%, 15,8% i 9,5%, respectivament, amb un total de 63 aïllats), amanides (87,9%, 12,1% i 0%, respectivament, amb un total de 33 aïllats), mentre que en els productes ecològics el grup majoritari d'aïllats va correspondre als enterobacteris no coliformes (56,7%), sent els coliformes el 43,2% dels aïllats (amb un total de 37 aïllats) (Taula 4.2).

Taula 4.2. Grups d'aïllats identificats en cada tipus de mostra analitzada.

Aïllats	Estàndard (n: 62)	Quarta gamma (n: 63)	Ecològics (n: 37)	Amanides (n: 33)	Total (n: 195)
Coliformes	50 (80,6%)	47 (74,6%)	16 (43,2%)	29 (88%)	142 (72,8%)
Enterobacteris (no coliformes)	10 (16,1%)	10 (15,8%)	21 (56,7%)	4 (12%)	45 (23,1%)
Altres Gram-negatius	2 (3,2%)	6 (9,5%)	0	0	8 (4,1%)

Si es compara el nombre d'aïllats totals en cada grup de mostres analitzades, normalitzant respecte del nombre de mostres (relació n° d'aïllats/n° de mostres), els resultats indiquen, d'acord amb les dades de la colimetria citades anteriorment, que les mostres amb major contaminació són les que corresponen a les amanides i productes de quarta gamma (amb una relació de 1,1 i 1,05 respectivament), mentre que les mostres de vegetals convencionals i ecològics estan menys contaminats (amb relació de 0,68 i 0,74, respectivament), sent la mitja total de 0.84 aïllats/mostra.

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.3. Espècies bacterianes aïllades en els distints grups de vegetals analitzats (ordenades pel nombre d'aïllats).

Espècie	Total	Estàndard	Quarta gamma	Ecològics	Amanides
<i>E. cloacae</i>	76 (38,97%)	29 (46,7%)	29 (46,03%)	5 (13,5%)	13 (39,3%)
<i>K. oxytoca</i>	25 (12,82%)	13(20,96%)	1 (1,58%)	2 (5,4%)	9 (27,2%)
<i>P. agglomerans</i>	17 (8,7%)	5 (8,06%)	1 (1,58%)	9 (24,3%)	2 (6,06%)
<i>S. marcescens</i>	12 (6,15%)	2 (3,22%)	3 (4,76%)	6 (16,2%)	1 (3,03%)
<i>K. pneumoniae</i>	11 (5,6%)	6 (9,67%)	4 (6,34%)	1 (2,7%)	
<i>E. sakazakii</i> *	8 (4,15%)		5 (7,93%)	2 (5,4%)	1 (3,03%)
<i>C. freundii</i>	6 (3,07%)		3 (4,76%)		3 (9,09%)
<i>Kl. ascorbata</i>	6 (3,07%)	2 (3,22%)	2 (3,17%)	1 (2,7%)	1 (3,03%)
<i>E. aerogenes</i>	5 (2,56%)		2 (3,17%)	3 (8,1%)	
<i>E. cancerogenus</i>	4 (2,05%)			2 (5,4%)	2 (6,06%)
<i>E. coli</i>	4 (2,05%)	2 (3,22%)	1 (1,58%)		1 (3,03%)
<i>F. oryzihabitans</i>	4 (2,05%)		4 (6,34%)		
<i>H. alvei</i>	4 (2,05%)		2 (3,17%)	2 (5,4%)	
<i>E. gergoviae</i>	2 (1,02%)		2 (3,17%)		
<i>Kl. cryocrescens</i>	2 (1,02%)			2 (5,4%)	
<i>Ps. putida</i>	2 (1,02%)		2 (3,17%)		
<i>S. plymuthica</i>	2 (1,02%)		2 (3,17%)		
<i>A. baumannii</i>	1 (0,51%)	1 (1,6%)			
<i>E. vulneris</i>	1 (0,51%)			1 (2,7%)	
<i>L. adecarboxylata</i>	1 (0,51%)			1 (2,7%)	
<i>S. rubidaea</i>	1 (0,51%)	1 (1,6%)			
<i>St. maltophilia</i>	1 (0,51%)	1 (1,6%)			
TOTAL	195	62	63	37	33

* Actualment *Cronobacter* spp.

L'espècie més freqüentment aïllada en totes les mostres és *Enterobacter cloacae*, majoritària en els vegetals estàndard (47%), de quarta gamma (46%) i amanides (39%), mentre que en els productes vegetals ecològics l'espècie més freqüent és *Pantoea agglomerans* (24%). A continuació, com espècies més freqüents trobem *Klebsiella oxytoca* (13% dels aïllats totals), *P. agglomerans* (8,7%), *Klebsiella pneumoniae* (5,6%), *Serratia marcescens* (6%), *Enterobacter sakazakii* (actualment *Cronobacter* spp.) (4,1%), *Kluyvera ascorbata* (3%), *Citrobacter freundii* (3%), *Enterobacter aerogenes* (2,5%), *Flavimonas oryzihabitans* (2%), *Hafnia alvei* (2%), *Escherichia coli* (2%), *Enterobacter cancerogenus* (2%), *Enterobacter gergoviae* (1%), *Kluyvera cryocrescens* (1%), *Pseudomonas putida* (1%), *Serratia plymuthica* (1%), *Acinetobacter baumannii* (0,5%), *Escherichia vulneris* (0,5%), *Leclercia adecarboxylata* (0,5%), *Serratia rubidaea* (0,5%) i *Stenotrofomonas maltophilia* (0,5%). En la taula 4.3 i a l'Annex II es mostren les dades corresponents a cada grup de productes vegetals analitzats. Els resultats de cada tipus de vegetal analitzat es mostra a les figures de l'Annex II.

Taula 4.4. Aïllats identificats, agrupats per gèneres, en els distints grups de mostres analitzades.

Gènere	Total	Estàndard	Quarta gamma	Ecològics	Amanides
<i>Enterobacter</i>	95 (49,71%)	29 (46,77%)	38 (60,31%)	12 (32,4%)	16 (48,48%)
<i>Klebsiella</i>	36 (18,46%)	19 (30,64%)	5 (7,93%)	3 (8,1%)	9 (27,27%)
<i>Pantoea</i>	17 (8,71%)	5 (8,06%)	1 (1,58%)	9 (24,32%)	2 (6,06%)
<i>Serratia</i>	15 (7,69%)	3 (4,83%)	5 (7,93%)	6 (16,21%)	1 (3,03%)
<i>Kluyvera</i>	8 (4,1%)	2 (3,22%)	2 (3,17%)	3 (8,10%)	1 (3,03%)
<i>Citrobacter</i>	6 (3,07%)		3 (4,76%)		3 (9,09%)
<i>Escherichia</i>	5 (2,56%)	2 (3,22%)	1 (1,58%)	1 (2,70%)	1 (3,03%)
<i>Flavimonas</i>	4 (2,05%)		4 (6,34%)		
<i>Hafnia</i>	4 (2,05%)		2 (3,17%)	2 (5,40%)	
<i>Pseudomonas</i>	2 (1,03%)		2 (3,17%)		
<i>Acinetobacter</i>	1 (0,5%)	1 (1,61%)			
<i>Leclercia</i>	1 (0,5%)			1 (2,70%)	
<i>Stenotrophomonas</i>	1 (0,5%)	1 (1,61%)			
Total	195	62	63	37	33

Si s'agrupen les espècies per gèneres (Taula 4.4), s'observa que dos terços dels aïllats (68%) corresponen a sols dos gèneres de coliformes: *Enterobacter* (49,71%) i *Klebsiella* (18,46%), seguits en ordre de freqüència per *Pantoea* (8,71%), *Serratia* (7,69%), *Kluyvera* (4,1%), *Citrobacter* (3,07%), *Escherichia* (2,56%), *Flavimonas* (2,05%), *Hafnia* (2,05%), *Pseudomonas* (1,03%), i *Acinetobacter*, *Leclercia* i *Stenotrophomonas* (0,5% cadascun). Cal destacar que els productes ecològics mostren una major freqüència d'aïllats que pertanyen als gèneres *Pantoea* (24,34%) i *Serratia* (16,21%) (enterobacteris no coliformes), respecte als altres grups de vegetals, i que no es va aïllar en les mateixos cap espècie bacteriana que no pertany als enterobacteris, que sol s'aïllaren en mostres de vegetals estàndard (*Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, 1,61% en els dos casos) i productes de quarta gamma (*Pseudomonas* i *Flavimonas*, 3,17% i 6,34% respectivament) (Taules 4.3 i 4.4). Aquesta observació en el cas dels productes de quarta gamma pot considerar-se significativa, ja que aquests aïllats (no enterobacteris) representen aproximadament un 10% (Taula 4.2), que es redueix a un 3,2% en els productes estàndard, i al 0% en els productes ecològics i les amanides. Cal remarcar que les diferències qualitatives entre la contaminació bacteriana dels productes vegetals estàndard i ecològics pot estar relacionada amb les pràctiques agrícoles.

Els resultats que s'han obtingut per cadascun dels vegetals analitzats es mostren en les figures de l'annex I. Com aspectes rellevants hi ha que indicar els següents:

(i) Les carlotes cultivades convencionalment van ser els productes amb major contaminació bacteriana, ja que un 50% de les mostres (n: 10) contenien el màxim nombre

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

detectable de coliformes/g, sent aquest percentatge menor en les carlotes ecològiques (10%, n: 10).

(ii) El nivell de contaminació dels distints tipus d'enciams va mostrar diferències en funció de l'origen de les mostres, sent les més contaminades les de quarta gamma (20% amb el màxim detectable de coliformes/g i sol un 10% de mostres sense contaminació, n: 20), mentre que les mostres convencionals i ecològiques estaven menys contaminades (5% amb la màxima càrrega de coliformes i 50% sense contaminació en el cas dels productes convencionals, n: 20; 0% amb la màxima càrrega bacteriana i 50% sense contaminació, en el cas de productes ecològics, n: 20). Aquest resultat contrasta amb una observació anterior en la que es descriu un major contingut d'entrobacteris en els enciams convencionals (Oliveira *et al.*, 2010). Els cogollos convencionals estaven més contaminats que els enciams convencionals (30% amb la màxima càrrega de coliformes, i un 50% sense contaminar, n: 10).

(iii) Les tomates van mostrar un menor contingut de càrrega bacteriana, tant les tomates convencionals (sols un 5% mostraren la màxima càrrega, mentre que un 70% no contenien coliformes, n: 40) com ecològiques (0% amb la màxima càrrega de coliformes, i 90% sense contaminació, n: 10).

(iv) En el cas de la rúcula, també s'observaren diferències en la contaminació bacteriana entre les ecològiques i les de quarta gamma, aquestes últimes estaven molt més contaminades. La rúcula ecològica (n: 10) va mostrar la màxima contaminació detectable en un 10% de les mostres, i el 10% no presentava contaminació; les mostres de quarta gamma (n: 20) mostraren la màxima contaminació en el 40% dels casos, i el 10% estaven sense contaminar.

(v) Els canonges de quarta gamma (n: 20) van presentar una contaminació més baixa que els altres dos tipus de vegetals de quarta gamma analitzats (enciam iceberg i rúcula), amb un 0% de mostres amb la màxima contaminació, i un 55% de mostres sense contaminació detectable.

(vi) Les mostres de cogombre convencionals (n: 10) van presentar baixos nivells de coliformes (0% amb la màxima contaminació, i 80% sense contaminació detectable).

Aquests resultats indiquen que en general, els productes convencionals més contaminats són aquells que estan més exposats a les possibles fonts de contaminació (sòl, fertilitzants orgànics com el fem, aigua de reg), com les carlotes. A més, l'anàlisi individualitzat dels productes vegetals confirma l'observació, anteriorment indicada, de que els productes ecològics presenten, en general, una menor contaminació, mentre que els

més contaminats són els de quarta gamma (rúcula i enciam), amb l'excepció dels canonges. Hi ha que destacar que tant en l'àrea de València, origen de la majoria de les mostres analitzades, com en altres zones de regadiu de Espanya, és una pràctica habitual l'ús de fertilitzants d'origen animal (fem) en els camps de cultiu, i això pot representar una important font de contaminació dels productes vegetals (Solomon *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2005; Chee-Sanford *et al.*, 2009; Venglovski *et al.*, 2009; Martí *et al.*, 2013). Tanmateix, l'ús d'aigua de reg contaminada pot permetre l'accés dels bacteris a la superfície dels vegetals cultivats (Bouwet & Idelovitch, 1987; Solomon *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2006; Rahube *et al.*, 2014). Encara que la presència d'enterobacteris en els productes analitzats pot deure's en gran part a contaminació d'origen animal, hi ha que recordar que moltes de les espècies aïllades també són habitants de la fillosfera, on poden mantenir-se i proliferar com microbiota pròpia de les superfícies vegetals. No hi ha que oblidar que algunes espècies d'enterobacteris han desenvolupat la capacitat d'adaptar-se al medi vegetal, utilitzant mecanismes en part similars als que els permeten colonitzar superfícies i mucoses dels mamífers (Dong *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 2003; Barak *et al.*, 2004; Brandl, 2006; Mandrell *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2006; Heaton & Jones, 2008; Carter *et al.*, 2011). Entre aquests mecanismes està la capacitat d'adherir-se a les superfícies vegetals, la capacitat de formació de biopel·lícules en aquestes superfícies, i la capacitat d'utilitzar com nutrients molècules de la planta que es troben accessibles a la seva superfície. A més, els bacteris també poden colonitzar les zones danyades de la superfície vegetal, on les condicions per la seva proliferació són més favorables, per la humitat i la major accessibilitat als nutrients, i poden en ocasions causar infeccions internes en els vegetals (Brandl, 2006; Heaton & Jones, 2008).

El fet de que els productes de quarta gamma presenten uns majors nivells de contaminació que els productes convencionals indiqui que el processament dels vegetals per la seva comercialització com productes de quarta gamma no elimina eficaçment la seva contaminació bacteriana, o inclòs que aquesta pot augmentar durant aquesta manipulació. Hi ha que indicar que el trossejat d'aquests productes, com és el cas dels enciams i en menor mesura de la rúcula, pot afavorir la proliferació de la contaminació bacteriana al permetre el seu accés a nutrients intracel·lulars del vegetal, especialment si la cadena de fred no està perfectament controlada fins el moment de la venda al consumidor, o fins el moment en que aquest consumeisca el producte. Aquests resultats suggereixen que els rentats convencionals són inefectius per l'eliminació de la càrrega microbiana dels vegetals, probablement degut a que molts bacteris estan adherits a la superfície vegetal mitjançant

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

diferents mecanismes que no són contrarestats per mètodes de rentat convencional (Soriano *et al.*, 2000; Burnett & Beuchat, 2001; Davidson *et al.*, 2013). Per aquesta mateixa raó, les mostres d'amanides presenten nivells de contaminació elevats. L'adhesió dels bacteris a la superfície vegetal i la seva internalització en els teixits vegetals (Barak *et al.*, 2004; Brandl, 2006; Mandrell *et al.*, 2006; Heaton & Jones, 2008; Carter *et al.*, 2011) poden limitar en gran part la utilitat dels mètodes convencionals de processament i higienització utilitzats en la preparació dels productes de quarta gamma, així com minimitzar l'efecte del rentat dels productes contaminats, per la qual cosa la prevenció de la contaminació d'aquests productes vegetals és un punt essencial de control de la seva qualitat i seguretat higiènica (aquest aspecte es discutirà més endavant en aquest resum). Cal indicar que resultats preliminars realitzats a l'inici del treball presentat en aquesta tesi doctoral van demostrar que el rentat exhaustiu dels vegetals amb aigua no millora significativament els nivells de contaminació detectats (resultats no mostrats). Per tant, la disminució de la càrrega microbiana dels vegetals abans del seu consum, a més d'evitar la contaminació dels vegetals, principalment en el camp de cultiu, implicaria el rentat i tractament amb substàncies antibacterianes (com l'ús de desinfectants diluïts, com l'hipoclorit sòdic, o detergents suaus capaços de contrarestar la capacitat d'adhesió bacteriana a la superfície vegetal) (Soriano *et al.*, 2000; Burnett & Beuchat, 2001; Davidson *et al.*, 2013).

En aquest estudi no s'han detectat bacteris patògens, com *E. coli* O157:H7 (encara que els quatre aïllats identificats com *E. coli* no es van caracteritzar a nivell de soca), *Salmonella* i *Shigella*. No obstant, la presència en els vegetals frescos, que són ingerits preferentment crus pel consumidor, de bacteris patògens oportunistes, presents com microbiota epifítica pròpia del vegetal, o com contaminants procedents del sòl o de fonts d'origen animal o humà, poden representar un risc potencial d'infecció pel consumidor, especialment si està immunodeprimit o debilitat. De fet, la població de persones immunodeprimides o debilitades per diferents causes (pacients trasplantats, malalts de càncer, malalties del sistema immunitari causades per alteracions genètiques o per infeccions com la SIDA, malalties subjacents debilitants, com la diabetis, així com la població infantil o els ancians) està augmentant molt en les últimes dècades, degut fonamentalment als avanços mèdics.

Globalment, els resultats obtinguts indiquen que bona part dels productes vegetals analitzats tenen contaminació microbiana per enterobacteris. Donada la ubiqüitat de moltes d'aquestes espècies (sòl, aigües, fillosfera, etc.) no pot concloure's que existeisca

contaminació fecal d'aquests aliments, ja que sols s'ha aïllat l'espècie *E. coli* en quatre de les 230 mostres analitzades. Les soques aïllades d'enterobacteris no representen un risc important per la salut dels consumidors en general, ja que no s'ha detectat la presència de patògens humans rellevants, com s'ha comentat anteriorment. Tanmateix, la majoria de les espècies identificades poden actuar com patògens oportunistes causant un problema greu si el consumidor està immunodeprimit o debilitat per diferents causes (ancians, lactants, dones gestants, malalts amb diverses patologies, etc., es a dir, els grups considerats de risc), com s'ha indicat anteriorment. Especialment rellevant es el cas de les persones ancianes, ja que diversos factors poden afavorir el desenvolupament d'infeccions oportunistes; entre aquests factors cal citar el deteriorament del sistema immunitari (immunosenesescència), alteracions en el metabolisme dels medicaments, inclosos els antibiòtics, conseqüència de les alteracions funcionals de òrgans interns, com el fetge i el ronyó, així com l'alta prevalença de comorbiditat i polifarmàcia (Panda *et al.*, 2009; Blair, 2010; Shi & Klotz, 2011; McLachlan & Pont, 2012; Shaw *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2013; Ikram *et al.*, 2015).

Per tant, des del punt de vista de la seguretat alimentària seria aconsellable un major control de la càrrega microbiana dels productes vegetals frescos que es poden consumir directament sense cap processat posterior, i prendre mesures preventives per a evitar la contaminació d'aquests aliments, especialment mitjançant el control de les aigües de reg, adobs d'origen animal com el fem, així com la contaminació encreuada a partir d'utensilis, superfícies o manipuladors. En aquest sentit, cal indicar que s'ha suggerit l'ús de dietes baixes en contingut microbià per tal de garantir la seguretat alimentària de la població vulnerable (Lund, 2014). Els nostres resultats suggereixen que l'origen de la contaminació per enterobacteris prové del sòl, fem o aigua de reg, ja que la mostra menys contaminada és la de la tomata, que és l'hortalissa que està més lluny del sòl, de les analitzades. Hi ha que indicar que la contaminació detectada, tant qualitativa com quantitativament, és pareguda a la descrita per altres autors en productes vegetals frescos no ecològics (Schwaiger *et al.*, 2011a). A continuació es citen breument les principals característiques com patògens oportunistes de les distintes espècies aïllades, per tal de indicar el seu potencial com a factor de risc en els col·lectius més sensibles.

Acinetobacter baumannii. Les espècies del gènere *Acinetobacter* es distribueixen àmpliament en la natura, aïllant-se del sòl, on contribueixen a la seva mineralització, i de l'aigua, on poden sobreviure en presència de sabons i altres desinfectants. Degut a la simplicitat en els seus requeriments nutricionals i a la capacitat per a utilitzar una gran varietat de fonts de carboni mitjançant diferents rutes metabòliques, *A. baumannii* es pot

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

trobar en múltiples medis, tan animats com inanimats. És una important font d'infecció en els hospitals pels pacients debilitats, ja que algunes soques poden viure en diverses superfícies de l'àmbit hospitalari, i així han pogut ser aïllats en aparells de ventilació mecànica, catèters, líquid de diàlisi peritoneal i en una ampla varietat d'instruments (Fukuta *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015). A més, pot formar part de la microbiota normal de la pell dels adults sans (especialment en les mans), i pot colonitzar la cavitat oral, faringe i intestí, generant-se d'aquesta manera reservoris epidemiològics molt importants en brots nosocomials (Peleg *et al.*, 2008; López-Ibáñez *et al.*, 2010; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013). Ocasionalment es pot aïllar dels productes alimentaris, pel que la seva determinació a partir de mostres vegetals, com es en el nostre cas de l'enciam, pot deure's a contaminació a partir del sòl durant el cultiu, i/o a la contaminació durant la manipulació post-collita.

Citrobacter freundii. S'ha associat a infeccions urinàries, infeccions en ferides superficials i bacterièmia, especialment en ancians i pacients immunocompromesos i hospitalitzats; colonitza el tracte gastrointestinal humà i d'altres animals i pot transl·locar-se al torrent sanguini donant lloc a septicèmies i peritonitis en pacients hospitalaris de risc (Drelichman *et al.*, 1985; Lavigne *et al.*, 2007; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Kataria & Saad, 2015).

Enterobacter aerogenes. És un bacteri nosocomial i patogen que ha augmentat la resistència a carbapenems en els últims temps (Tuon *et al.*, 2015). Es distribueix àmpliament en l'aigua, les aigües de claveguera, el sòl i les verdures. Forma part de la microbiota entèrica comensal, encara que es creu que no ocasiona diarrea. També s'associa amb diferents infeccions oportunistes que afecten les vies urinàries i respiratòries i les ferides cutànies; en ocasions, produeixen septicèmia i meningitis (Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013).

Enterobacter cancerogenus. Generalment es pot aïllar de fonts ambientals o vegetals i es considera sobre tot fitopatogen. És un microorganisme patogen potencial en determinades circumstàncies. Causa distintes infeccions clíniques, que inclouen osteomielitis després d'una fractura oberta, infecció de ferides, sobre tot després d'un traumatisme greu o lesions per esclafament, infeccions en les vies urinàries i bacterièmia i pneumònia (Boyer *et al.*, 2011; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013; Demir *et al.*, 2014).

Enterobacter cloacae. Forma part de la microbiota normal del tracte gastrointestinal en el 40-80% dels éssers humans. Creix fàcilment en els medis comuns de cultiu, encara que

la capacitat de fermentar la lactosa varia entre soques. També és freqüent en l'entorn hospitalari, probablement degut a la seva resistència als desinfectants i antimicrobians, i s'associa amb infeccions del tracte urinari, ferides quirúrgiques, inclòs bacterièmies, i es considerat com un agent etiològic d'infeccions nosocomials en pacients immunocompromesos (Gaston, 1988; Boyer *et al.*, 2011). És freqüent també en l'aigua i en el sòl, pel que pot trobar-se en la verdura per contaminació de l'aigua de reg; tanmateix també es pot suggerir una contaminació d'origen ambiental, degut al processat dels vegetals o a partir de l'entorn (altres aliments, superfícies de contacte, utensilis) donada la ubiqüitat d'aquest microorganisme. Històricament s'ha considerat com un organisme comensal inofensiu, però al igual que amb altres espècies d'*Enterobacter*, s'ha convertit en una important causa d'infeccions nosocomials. En general s'associa amb la contaminació de líquids per via intravenosa, les solucions de nutrició parenteral, pròtesis i material quirúrgic (Butikofer *et al.*, 2013; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013).

Enterobacter gergoviae. Encara que les espècies d'*Enterobacter* són freqüentment la causa d'infeccions nosocomials per bacteris Gram-negatius, *E. gergoviae* no és un patògen humà important (Diekema *et al.*, 1997; Ganeswire *et al.*, 2003; Hidron *et al.*, 2008). Es va descriure per primera vegada en l'any 1976 i es va trobar en diverses localitzacions ambientals, incloent aigües residuals, sòl i aliments. En un estudi multicèntric internacional sols el 0,5% de les bacterièmies per *Enterobacter* eren causades per *E. gergoviae*. S'ha descrit que pot causar infeccions en pacients immunocompromesos (edat extrema, SIDA, i tumors malignes) on pot causar bacterièmia i xoc sèptic, infeccions respiratòries, infeccions urinàries, ostiomeilitis i endoftalmitis traumàtica (Manzano *et al.*, 1991; Marcos *et al.*, 2005; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Satlin *et al.*, 2013; Sievert *et al.*, 2013).

Enterobacter sakazakii. Actualment anomenat *Cronobacter* spp., és un patògen alimentari emergent que causa meningitis greu, sèpsia i l'enterocolitis necrotitzant en nadons i lactants, infeccions que s'han registrat en diferents parts del món. (Holy & Forsythe, 2014; Yan & Fanning, 2015). L'epidemiologia de *Cronobacter* spp. és encara desconeguda (Forsythe *et al.*, 2014), i la majoria de les soques s'han aïllat a partir de mostres clíniques i d'una varietat d'aliments, que inclouen el formatge, la carn, la llet, verdures, grans, espècies i herbes (Gurtler *et al.*, 2005; Belal *et al.*, 2013).

Escherichia coli. Representa un dels millors indicadors de contaminació fecal tant en l'aigua com en els aliments, ja que al estar perfectament adaptat a l'ambient entèric no pot resistir molt de temps fora d'ell, encara que és capaç de multiplicar-se en aliments i superfícies. Encara que està considerat com comensal del tracte intestinal de l'home i

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

animals, pot causar una sèrie de infeccions nosocomials (urinàries, intraabdominals, meningitis, de pell i teixits blans, bacterièmies, entre altres), i certes soques són patogèniques i poden causar síndromes diarreics i infeccions intestinals en persones sanes, així com infeccions extraintestinals (Donnenberg & Whittam, 2001; Manges & Johnson, 2012; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013; Ikram *et al.*, 2015; Sahl *et al.*, 2015).

Escherichia vulneris. Ha sigut reconeguda com nova espècie de la família dels enterobacteris des de l'any 1982. S'ha aïllat en animals, aigua potable i humans, on pot colonitzar el tracte respiratori, tracte genital femení i tracte urinari (Arslan *et al.*, 2008). També pot produir infeccions en les ferides, urosepsis i bacterièmia relacionades amb catèters intravenosos, ostiomelitis, sèpsia i meningitis (Mohanty *et al.*, 2005; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

Flavimonas oryzihabitans. És un bacil Gram-negatiu (no pertanyent als enterobacteris), aerobi i mòbil, que es troba habitualment en el sòl, desguàs, arrossars i ambients constantment humits. És un patògen nosocomial, que produeix infecció en pacients immunocompromesos, on pot causar septicèmies, peritonitis i bacterièmia (Cusimano & Husserl, 1997; Lin *et al.*, 1997; Bhatawadekar, 2013; Nei *et al.*, 2015).

Hafnia alvei. És un microorganisme Gram-negatiu, anaerobi facultatiu, que rarament causa infeccions en humans. Pot trobar-se en el sòl, aigua i moltes espècies d'animals, especialment mamífers on colonitza el tracte gastrointestinal (Rodríguez-Guardado *et al.*, 2000). No està ben definida la importància clínica d'aquesta espècie, encara que el microorganisme ha sigut recuperat de les femtes humanes en absència de símptomes. S'han comunicat casos aïllats d'infecció en persones en ferides, abscessos, esputs, orina, sang i altres llocs i existeixen proves com per a suggerir que *Hafnia alvei* pot ser causa de gastroenteritis bacteriana aguda (Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Stanic *et al.*, 2015).

Klebsiella oxytoca. La seva presència és comú en el sòl i en l'aigua, mamífers i insectes. Aquesta espècie és patògen oportunista que causa diferents infeccions nosocomials, septicèmia, pneumònia, infeccions en el tracte urinari i colitis hemorràgica associada a antibiòtics (Cox *et al.*, 2013; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013).

Klebsiella pneumoniae. És una espècie que sol trobar-se àmpliament distribuïda en la natura (aigües superficials, plantes i sòl) i en les mucoses dels mamífers (tracte intestinal, nasofaringe i pell de les persones). Es pot trobar en la verdura tan per contaminació directa del sòl, com per introducció en l'aliment per mala manipulació d'aquest. És un dels

patògens més importants responsables de brots nosocomials en tot el món, i és molt comú que causa infeccions oportunistes en immunodeprimits, i produeix principalment infeccions en el tracte urinari, infeccions en els teixits blans, septicèmia e infeccions respiratòries (pneumònies) (Keynan & Rubinstein, 2007; López-Ibáñez *et al.*, 2010; Peirano *et al.*, 2012; Berrazeg *et al.*, 2013; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013; Bachman *et al.*, 2015).

Kluyvera ascorbata. Es troba en aigua corrent i en les aigües residuals, en el sòl, aliments, l'ambient hospitalari, i són sapròfits i/o patògens d'animals. La presència d'aquest microorganisme en productes vegetals pot deure's a contaminació amb aigües residuals o pel sòl agrícola. Inicialment aquest gènere era considerat com a comensal de les vies respiratòries altes i de l'aparell digestiu, però palatinament han aparegut nous casos d'aïllaments clínics (esputs, orina, femtes, sang, frotis de faringe) atribuint-li en molts casos un paper patògen en pacients immunocompromesos (oportunistes), ja que pot causar varies infeccions, i encara que és poc freqüent, també pot provocar sèpsies greus (Sarria *et al.*, 2001; Moonah *et al.*, 2010; López-Larramona *et al.*, 2013; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

Kluyvera cryocrescens. Anteriorment acceptat com un microorganisme sapròfit benigne, ara es considerat com un patògen oportunista encara que la seva infecció és molt rara en els éssers humans. El potencial de *Kl. cryocrescens* com un patògen seriós afecta sobre tot als nadons prematurs, en els que el pronòstic pot veure's compromès sense el tractament adequat (Sarriá *et al.*, 2001; Altun Koroglu *et al.*, 2010; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

Leclercia adecarboxylata. És un microorganisme amb ubiqüitat, s'ha documentat la seva presència en el sòl, aigua, aliments, diversos espècimens humans (sang, esputs, femtes, exudat de ferides, líquid peritoneal, líquid articular i bilis), així com en diversos fòmites (inclòs els catèters). En humans, en la majoria de casos descrits, és un oportunista que produeix, en pacients immunocompromesos, infeccions polimicrobianes, un gran nombre de les quals corresponen a infeccions de parts blanques de l'extremitat inferior, generalment després d'un traumatisme o, en menor freqüència, sobre una malaltia vascular prèvia. També s'aïlla amb freqüència, en aquest cas en cultiu pur, en mostres de sang de pacients amb immunodepressió greu i en menor freqüència pot produir quadres de pneumònia, colecistitis o peritonitis (Beltrán *et al.*, 2004; Keren *et al.*, 2014).

Pantoea agglomerans. Aquest enterobacteri s'aïlla freqüentment de plantes (superfícies i llavors), verdures i fruites, encara que també s'ha aïllat en femtes, tan

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

d'animals com d'humans. La seva contaminació en productes vegetals pot deure's a contaminació amb aigües residuals, encara que pot ser habitant normal de la fillosfera. És un patogen oportunista, causant infeccions urinàries en immunodeprimits; també és capaç d'actuar com patogen oportunista en infeccions localitzades en la pell, produïdes per espines o estelles de plantes, i s'han descrit diferents casos de sèpsia en nounats i lactants, i encara que no és habitual, poden resultar inclòs mortals (Uche, 2008; Segado *et al.*, 2012; Kazancioglu *et al.*, 2014).

Pseudomonas putida. És un membre del gènere *Pseudomonas* que produeix fluorescència i té interès aplicat, ja que unit al seu potencial de degradació de components aromàtics i xenobiòtics, presenta la capacitat de colonitzar el sistema radicular de les plantes, formant biopel·lícules i de ser manipulable des del punt de vista genètic. Es troba en la majoria dels hàbitats de sòl i aigua. És un patogen oportunista de baixa virulència i pot produir malalties nosocomials, com pneumònia, infeccions del tracte urinari, infeccions nounats i bacterièmia en adults (Fujita *et al.*, 1998; Yoshio *et al.*, 2011; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

Serratia marcescens. Es troba en aigua, sòl, plantes i animals, així com en el tracte respiratori, gastrointestinal i urinari. És el membre més important del gènere *Serratia* i a sovint s'associa amb distintes infeccions humanes, sobre tot pneumònia i septicèmia en pacients amb processos malignes que estan rebent agents quimioteràpics, i també pot causar meningitis i infeccions del tracte urinari (Mahlen, 2011; Montagnani *et al.*, 2015). En l'actualitat aquest microorganisme és reconegut com un patogen important amb propietats invasives i una tendència a resistir a molts antibiòtics d'ús freqüent, pel que és considerat com un oportunista hospitalari important (Alonso & Baquero, 1994; Samonis *et al.*, 2001; López-Ibáñez *et al.*, 2010; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013).

Serratia plymuthica. El seu hàbitat predominant és l'aigua, però pot aïllar-se del sòl, plantes, insectes i animals, i a voltes de mostres clíniques. És un microorganisme de relativa importància clínica com patogen nosocomial, que no és capaç de causar infeccions greus en humans, encara que s'han descrit casos de ostiomelitis o sèpsia associada amb catèters venosos (Domingo *et al.*, 1994; Carrero *et al.*, 1995; Alonso & Baquero, 1994; López-Ibáñez *et al.*, 2010; Mahlen, 2011; Samonis *et al.*, 2011; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013).

Serratia rubidaea. Enterobacteri que té un hàbitat poc conegut, s'ha trobat en la natura en fruites i vegetals, no així en l'aigua, insectes, petits mamífers i altres animals. És un

patogen oportunista, generalment nosocomial, que afecta a pacients debilitats i immunocompromesos, i s'ha descrit com agent causal d'infeccions del tracte urinari, respiratori, d'úlceres o de ferides, havent-se aïllat en pell, excrements, bilis i sang (Sekhsokh *et al.*, 2007; Vijayakrishnan *et al.*, 2010; Mahlen, 2011; Samonis *et al.*, 2011; Sievert *et al.*, 2013; Gentile *et al.*, 2014).

Stenotrophomonas maltophilia. Anteriorment anomenat *Pseudomonas maltophilia* i *Xanthomonas maltophilia*, és un bacil Gram-negatiu no fermentador. El seu l'hàbitat habitual és l'aquàtic (rius, pous, aigües residuals, etc.), si bé es troba també en el sòl, en alguns aliments, així com en plantes i en animals. En l'home s'ha aïllat de distintes parts del cos, i actualment es considera com un patògen nosocomial emergent (Paez & Costa, 2008; Falagas *et al.*, 2008b; Chawla *et al.*, 2014).

4.2. RESISTÈNCIES ALS ANTIBIÒTICS EN ELS AÏLLATS IDENTIFICATS

Com conseqüència dels resultats exposats a l'apartat anterior, el segon objectiu d'aquesta tesi ha abordat la determinació de la presència de bacteris resistents, que encara sent poc perillosos pel consumidor per el seu caràcter no patogen (o per la baixa càrrega microbiana dels vegetals), poden contribuir, una vegada ingerits, a la disseminació de les resistències entre la microbiota del consumidor, i per tant, en la comunitat. Aquest fenomen pot ocórrer en el consumidor sense que aquest presenti signes de malaltia o infecció, pel que pot considerar-se, tal com es proposa en aquesta tesi doctoral, com un problema silenciós de seguretat alimentària.

Com antibiòtics elegits per detectar la presència de resistències s'han utilitzat onze agents quimioteràpics habitualment emprats en clínica pel tractament d'infeccions per bacteris Gram-negatius (Cantón *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2010, 2011), com és el cas dels enterobacteris, tal com s'ha descrit detalladament en la introducció. Els onze agents utilitzats han sigut:

- Ampicil·lina i amoxicil·lina/clavulànic (Augmentine) (dos antibiòtics del grup de les penicil·lines, beta-lactàmics inhibidors de la síntesi de mureïna, i un inhibidor de beta-lactamases)
- Cefotaxima i cefotaxima (cefalosporines de tercera generació, també beta-lactàmics inhibidors de la biosíntesi de mureïna)
- Ciprofloxacino (agent del grup de les quinolones, inhibidors de la replicació del l'ADN a l'inhibir a l'ADN girasa bacteriana)

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

- Estreptomycina i gentamicina (antibiòtics aminogluco-sídics, inhibidors de la síntesi proteica)
- Cloramfenicol (inhibidor de la síntesi proteica)
- Nitrofurantoïna (nitroderivat que desnatura l'ADN)
- Clotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim, inhibidors de la síntesi d'àcid fòlic)
- Tetraciclina (inhibidor de la síntesi de proteïnes)

Aquest grup d'antibiòtics abasta molècules molt distintes entre sí, que pertanyen als principals grups d'antimicrobians efectius front a bacteris Gram-negatius, amb mecanismes d'acció molt variats i front als quals els bacteris poden desenvolupar també distints mecanismes de resistència.

Amb l'elecció dels antibiòtics abans citats, s'ha abordat el segon objectiu plantejat en aquesta tesi doctoral i els seus resultats es descriuen a continuació. Cal indicar que la metodologia utilitzada, basada en tècniques microbiològiques clàssiques (descrites anteriorment), han permès en ocasions, l'aïllament e identificació de bacteris Gram-negatius que no pertanyen a la família dels enterobacteris, que també han sigut inclosos en l'estudi de la resistència als quimioteràpics.

A partir de tots els aïllats que s'han obtingut i identificats a partir de les distintes mostres de vegetals frescos, es va procedir a realitzar posteriorment la prova de l'antibiograma. Per això es va utilitzar el mètode de l'antibiograma per difusió en agar (Bauer *et al.*, 1966; Cantón *et al.*, 2011) que és un dels mètodes que el "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) recomana per la determinació de la sensibilitat bacteriana als antimicrobians (CLSI, 2010; Navarro *et al.*, 2010, 2011). A partir de les diferents plaques amb els aïllats en cultiu pur es van prendre, en condicions estèrils, varies colònies que es van resuspendre en sèrum fisiològic estèril, ajustant l'innòcul a una terbolesa equivalent al 0,5 de l'escala de McFarland (Escala "McFarland Standard" BioMérieux). Amb aquesta suspensió es van sembrar plaques d'agar Mueller-Hinton (Liofilchem, Itàlia) utilitzant un hisop per a aconseguir una sembra uniforme en tota la superfície de les mateixes. A continuació es van col·locar els discs d'antibiòtics (11 antibiòtics distintes; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Anglaterra). Els discs no es col·locaren a menys de 15 mm de la vora de la placa i es van distribuir de manera que no hi hagueren superposicions dels halos d'inhibició (s'utilitzaren 5 o 6 discs en cada placa). Després de 24 hores d'incubació a 37° C es van mesurar els diàmetres dels halos d'inhibició que s'han obtingut, que foren comparats amb els valors de referència de

resistència o sensibilitat (R i S, respectivament) dels distints antibiòtics utilitzats, per a determinar la resistència/sensibilitat clínica del microorganisme a cada quimioteràpic.

Els resultats obtinguts referents a les resistències front a cada antibiòtic s'indiquen en la Taula 4.5 i a l'Annex III. Del total d'aïllats (n: 195), la majoria (74,8%) presenten resistència a l'ampicil·lina i també un percentatge alt són resistents a l'Augmentine (67,7%); les resistències a nitrofurantoïna són el 12,8%, a tetraciclina el 6,6% i a cefotaxima el 3,6%; les resistències a estreptomocina, clotrimoxazol, gentamicina, ceftazidima i cloramfenicol, són més baixes i estan al voltant del 1%. Hi ha un 11,3% d'aïllats que no presenten cap resistència, i també cal destacar que cap aïllat va presentar resistència a ciprofloxacino.

Si comparem les resistències per grups d'aliments (Taula 4.5), els resultats són similars al que s'ha descrit anteriorment. Els quatre grups de mostres analitzades [quarta gamma (n=63), estàndard (n=62), ecològics (n=37) i amanides (n=33)] presenten un percentatge elevat de resistència a l'ampicil·lina (65%, 85%, 83% i 63,6%, dels aïllats, respectivament), seguit de la resistència a Augmentine (73% en quarta gamma, 77,4% en les mostres estàndard i 69,6% en les amanides, mentre que aquest percentatge es menor en els productes ecològics, amb un valor del 40%). També podem remarcar que respecte a la resistència a la nitrofurantoïna, les mostres de quarta gamma i ecològiques presenten un percentatge major (19% i 16,2%, d'aïllats, respectivament) que les estàndard i les amanides (8% i 6%, respectivament). Cal destacar també: (i) la major freqüència de resistència a tetraciclina en els productes estàndard (11,2%) respecte dels altres (quarta gamma amb un 4,7%, ecològics amb un 5% i amanides amb un 3%), així com (ii) la major freqüència de resistència a cefotaxima que presenten els aïllats de les mostres ecològiques (10,8%), front als de quarta gamma (3,1%), estàndard (1,6%) i amanides (0%). Sols presenten resistència a la estreptomocina aïllats de les mostres de quarta gamma i estàndard amb un 3,1% i 1,6%, respectivament. Al clotrimoxazol presenten resistència aïllats de mostres estàndard i amanides amb un 3,2% i 3% respectivament. A la gentamicina presenten resistència aïllats de les mostres ecològiques i estàndard amb un 2,7% i 1,6% respectivament. Sols presenten resistència a ceftazidima el 1,5% d'aïllats de les mostres de quarta gamma, i sols presenten resistència al cloramfenicol el 1,6% dels aïllats de les mostres estàndard. També cal indicar que no presenten cap resistència el 9,5% dels aïllats de quarta gamma, el 11,2% de les mostres estàndard, el 13% dels ecològics i un 12,1% de les amanides. No presenta resistència al ciprofloxacino cap aïllat analitzat, com s'ha dit

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

anteriorment. Les resistències als antibiòtics dels aïllats agrupats per espècie es mostren en les figures de l'Annex III.

Taula 4.5. Resistències individuals per antibiòtic en els grups de vegetals frescos analitzats. En cada cas s'indica el nombre d'aïllats i el percentatge respecte del total.

Resistències a:	Total (n:195)	Quarta gamma (n:63)	Estàndard (n:62)	Ecològics (n:37)	Amanides (n:33)
Sense resistències	22 (11,3%)	6 (9,5%)	7 (11,2%)	5 (13,5%)	4 (12,1%)
Ampicil·lina	146 (74,8%)	41 (65%)	53 (85%)	31 (83,7%)	21 (63,6%)
Augmentine	132 (67,7%)	46 (73%)	48 (77,4%)	15 (40,5%)	23 (69,6%)
Cefotaxima	7 (3,58%)	2 (3,1%)	1 (1,6%)	4 (10,8%)	0
Ceftazidima	1 (0,51%)	1 (1,5%)	0	0	0
Ciprofloxacino	0	0	0	0	0
Cloramfenicol	1 (0,51%)	0	1 (1,6%)	0	0
Cotrimoxazol	3 (1,53%)	0	2 (3,2%)	0	1 (3%)
Estreptomicina	3 (1,53%)	2 (3,1%)	1 (1,6%)	0	0
Gentamicin	2 (1,02%)	0	1 (1,6%)	1 (2,7%)	0
Nitrofurantoina	25 (12,8%)	12 (19%)	5 (8%)	6 (16,2%)	2 (6%)
Tetraciclina	13 (6,66%)	3 (4,7%)	7 (11,2%)	2 (5,2%)	1 (3%)

Si fem referència a les multiresistències (Taula 4.6, i figures de l'Annex IV) que presenten el total d'aïllats (n: 195), trobem que un 11,3% no presenten cap resistència. Presenten una única resistència el 29,2%, dos resistències el 43,6%, tres resistències el 9,2%, quatre resistències el 5,6% i el 1% són resistents a cinc antibiòtics. També cal ressaltar que del percentatge d'aïllats que presenten dos resistències, el 96,5% presenten resistència conjunta a ampicil·lina i a Augmentine, donat que són penicil·lines àmpliament usades i que els bacteris posseeixen mecanismes de resistència similars front a aquests antibiòtics.

Dades similars s'han trobat en els productes de quarta gamma (n: 63), amb un 9,5% d'aïllats sense cap resistència, un 34,9% amb una resistència, el 36,5% amb dos resistències, un 12,7% amb tres resistències, un 4,8% amb quatre resistències i un 1,6% d'aïllats amb cinc resistències. En el cas del productes estàndard (n: 62), s'ha trobat un augment en el percentatge d'aïllats que presenten dos resistències (59,7%), que quintuplica el percentatge de resistències a un únic antibiòtic (11,3%). El percentatge d'aïllats sense resistències (11,3%) i amb tres resistències (11,3%) es semblant al global de totes les mostres, així com el percentatge de les soques amb quatre resistències (4,8%) i cinc resistències (1,6%).

En el cas dels productes ecològics, el màxim percentatge el presenten els aïllats amb una única resistència (43,2%), i a continuació els que presenten dos resistències (27%) i amb un percentatge similar (13,5%) els que no presenten cap resistència i els que presenten

quatre resistències, mentre que sols el 2,7% són resistents a tres agents quimioteràpics, no trobant-se cap aïllat amb cinc resistències. Cal destacar que els productes ecològics són els que més percentatge d'aïllats amb quatre resistències presenten.

Per últim, les amanides també presenten resultats similars: un 45,4% d'aïllats amb dos resistències, un 36,4% amb una resistència, un 12,1% amb cap resistència, un 6% amb tres resistències, i no hi ha cap aïllat amb quatre o cinc resistències.

Taula 4.6. Multiresistències. En cada cas s'indica el nombre d'aïllats i el percentatge respecte del total. IR₁₁ (Índex de resistència front als 11 antibiòtics utilitzats); IRR (Índex relatiu de resistència).

Nombre de resistències	Total (n:195)	Quarta gamma (n:63)	Estàndard (n:62)	Ecològics (n:37)	Amanides (n:33)
0	22 (11,28%)	6 (9,52%)	7 (11,29%)	5 (13,5%)	4 (12,12%)
1	57 (29,23%)	22 (34,92%)	7 (11,29%)	16 (43,24%)	12 (36,36%)
2	85 (43,58%)	23 (36,5%)	37 (59,67%)	10 (27,02%)	15 (45,45%)
3	18 (9,23%)	8 (12,69%)	7 (11,29%)	1 (2,7%)	2 (6,06%)
4	11 (5,64%)	3 (4,76%)	3 (4,8%)	5 (13,51%)	0
5	2 (1,02%)	1 (1,58%)	1 (1,6%)	0	0
IR ₁₁	1,71	1,73	1,91	1,59	1,45
IRR	0,155	0,157	0,173	0,144	0,132

Per a extraure una idea més precisa dels resultats, es compararen els resultats de les multiresistències en cada tipus de mostra analitzada, mitjançant un índex: IR₁₁ (índex de resistència front als 11 antibiòtics utilitzats), que nosaltres definim com el sumatori del total de resistències als antibiòtics, dividit pel nombre d'aïllats; per tant l'IR₁₁ indica el nombre mitjà de resistències de cada grup vegetal als onze antibiòtics emprats. Segons aquest índex, el valor més alt, i per tant amb més resistències, correspon a les mostres estàndard (1,91), sent el més baix el de les amanides (1,45), amb un índex mitjà del 1,71. Donat que aquest índex depèn del nombre d'antibiòtics emprats, hem definit un altre índex, l'IRR (índex relatiu de resistència), definit com el IR₁₁ dividit per 11 (nombre d'antibiòtics). Aquest índex (IRR) indica el nombre mitjà de resistències per antibiòtic. Com cal esperar, si comparem l'índex relatiu de resistències (IRR), també trobem el mateix resultat: el més alt correspon a les mostres estàndard (0,173) i el més baix a les amanides (0,132), amb un IRR mitjà de 0,155.

En la Taula 4.7 es mostren les multiresistències per espècies bacterianes (figures de l'Annex IV). En aquesta Taula cal destacar les dos soques d' *Enterobacter cloacae* que presenten cinc resistències, una s'ha trobat en carlota de les mostres estàndard, i presenti resistències a cefotaxima, clotrimoxazol, ampicil·lina, nitrofurantoïna i Augmentine, i

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

l'altra en un enciam iceberg dels productes de quarta gamma, i presentí resistències a estreptomina, ampicil·lina, nitrofurantoina, Augmentine i tetraciclina.

Taula 4.7. Multiresistències per espècies. S'indica el nombre d'aïllats de cada espècie i el nombre de resistències que presenten, així com el percentatge en cada cas. IR₁₁ (Índex de resistència front als 11 antibiòtics utilitzats); IRR (Índex relatiu de resistència).

Espècies	0	1	2	3	4	5	IR ₁₁	IRR
<i>E. cloacae</i> (n: 76)	5 (6,6%)	5 (6,6%)	49 (64,5%)	12 (15,8%)	3 (3,9%)	2 (2,6%)	2,12	0,192
<i>K. oxytoca</i> (n: 25)	2 (8,0%)	10 (40,0%)	12 (48,0%)	1 (4,0%)	0	0	1,48	0,134
<i>P.agglomerans</i> (n: 17)	5 (29,4%)	8 (47,0%)	3 (17,6%)	0	1 (5,9%)	0	1,05	0,095
<i>S. marcescens</i> (n: 12)	3 (25%)	4 (33,3%)	3 (25%)	0	2 (16,7%)	0	1,50	0,136
<i>K. pneumoniae</i> (n: 11)	0	4 (36,3%)	5 (45,4%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	0	1,91	0,173
<i>E. sakazakii</i> (n: 8)	1 (12,5%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)	0	1 (12,5%)	0	1,37	0,124
<i>C. freundii</i> (n: 6)	0	3 (50,0%)	2 (33,3%)	0	1 (16,7%)	0	1,83	0,166
<i>Kl. ascorbata</i> (n: 6)	0	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0	0	0	1,33	0,121
<i>E. aerogenes</i> (n: 5)	0	3 (60,0%)	2 (40,0%)	0	0	0	1,40	0,127
<i>E. cancerogenus</i> (n: 4)	1 (25,0%)	3 (75,0%)	0	0	0	0	0,75	0,068
<i>E. coli</i> (n: 4)	1 (25,0%)	2 (50,0%)	1 (25,0%)	0	0	0	1,00	0,091
<i>F. oryzihabitans</i> (n: 4)	0	1 (25,0%)	0	2 (50,0%)	1 (25,0%)	0	2,75	0,25
<i>H. alvei</i> (n: 4)	0	1 (25,0%)	2 (50,0%)	1 (25,0%)	0	0	2,00	0,182
<i>E. gergoviae</i> (n: 2)	2 (100%)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Kl. cryocrescens</i> (n: 2)	0	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0	0	0	1,50	0,136
<i>Ps. putida</i> (n: 2)	0	0	2 (100%)	0	0	0	2,00	0,182
<i>S. plymuthica</i> (n: 2)	0	2 (100%)	0	0	0	0	1,00	0,091
<i>A.baumannii</i> (n: 1)	0	0	0	0	1 (100%)	0	4,00	0,363
<i>E. vulneris</i> (n: 1)	0	1 (100%)	0	0	0	0	1,00	0,091
<i>L. adecarboxylata</i> (n: 1)	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. rubidaea</i> (n: 1)	0	0	0	1 (100%)	0	0	3,00	0,273
<i>St. maltophilia</i> (n: 1)	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0

També cal mencionar les 11 soques que presenten quatre resistències:

- (i) tres soques d'*E. cloacae*, una en les mostres de tomata estàndard amb les següents resistències: a clotrimoxazol, ampicil·lina, Augmentine, i tetraciclina, i dos en les mostres ecològiques, que presenten les mateixes resistències: cefotaxima, ampicil·lina, nitrofurantoïna i Augmentine.
- (ii) una soca de *P. agglomerans* en les mostres ecològiques, que presenta resistències a cefotaxima, ampicil·lina, nitrofurantoïna i Augmentine.
- (iii) dos soques de *S. marcescens*, una en les mostres de carlota estàndard i altra en les mostres ecològiques, que presenten les mateixes resistències: ampicil·lina, nitrofurantoïna, Augmentine i tetraciclina.
- (iv) una soca de *K. pneumoniae* de les mostres d'enciam iceberg dels productes de quarta gamma, que presente resistències a estreptomina, ampicil·lina, nitrofurantoïna i tetraciclina.
- (v) una soca d'*E. sakazakii* en les mostres ecològiques, amb resistències a cefotaxima, ampicil·lina, nitrofurantoïna i Augmentine.
- (vi) una soca de *F. oryzihabitans* en l'enciam iceberg de quarta gamma amb les següents resistències: cefotaxima, ampicil·lina, nitrofurantoïna i Augmentine.
- (vii) una soca de *C. freundii*, també en les mostres d'enciam iceberg de quarta gamma, que presenta resistències a ceftazidima, cefotaxima, ampicil·lina i Augmentine.
- (viii) una soca d'*A. baumannii* en l'enciam de les mostres estàndard, que presenta resistències a cloramfenicol, ampicil·lina, nitrofurantoïna i Augmentine.

Cal citar també les soques (18) que presenten tres resistències:

- (i) 12 soques d' *E. cloacae*, resistents a ampicil·lina, nitrofurantoïna i augmentine (set soques, dos en la rúcula, dos en canonges i una en enciam iceberg de quarta gamma, una en tomata i una en l'enciam de les mostres estàndard); resistents a ampicil·lina, nitrofurantoïna i tetraciclina (una soca, en les mostres d'enciam iceberg dels productes de quarta gamma); resistents a ampicil·lina, Augmentine i tetraciclina (tres soques, una en els cogollos, altra en la tomata de les mostres estàndard i una en les amanides), i una soca resistent a clotrimoxazol, ampicil·lina i tetraciclina en les amanides.
- (ii) una soca de *K. oxytoca* resistent a ampicil·lina, augmentine i tetraciclina, en les mostres de cogollos estàndard.

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

- (iii) una soca de *K. pneumoniae* resistent a ampicil·lina, Augmentine i tetraciclina, en les mostres de tomata estàndard.
- (iv) dos soques de *F. oryzihabitans* que presenten resistències a cloramfenicol, ampicil·lina i nitrofurantoïna, en les mostres de rúcula de quarta gamma.
- (v) una soca d'*H. alvei* en les mostres ecològiques, resistent a ampicil·lina, nitrofurantoïna i Augmentine.
- (vi) una soca de *S. rubidaea*, en les mostres de tomata estàndard, resistent a estreptomocina, ampicil·lina i tetraciclina.

Hi ha que destacar que l'espècie que presenta major nombre de soques amb dos resistències és *E. cloacae* (49 soques), seguida de *K. oxytoca* amb 12 soques, *K. pneumoniae* amb cinc soques, *P. agglomerans* i *S. marcescens* amb tres soques, *Kl. ascorbata*, *E. aerogenes*, *H. alvei*, *C. freundii* i *Ps. putida* amb dos soques cadascuna d'aquestes espècies i *E. coli*, *E. sakazakii* i *Kl. cryocrescens* amb una soca resistent a dos antibiòtics.

L'espècie que presenta un major nombre de soques resistents a un antibiòtic és *K. oxytoca* (10 soques), seguit de *P. agglomerans* (vuit soques), *E. cloacae* i *E. sakazakii* (cinc soques cadascuna), *S. marcescens*, *K. pneumoniae* i *Kl. ascorbata* (quatre soques), *E. aerogenes*, *C. freundii* i *E. cancerogenus* (tres soques), *E. coli* i *S. plymuthica* (dos soques) i *F. oryzihabitans*, *H. alvei*, *Kl. cryocrescens* i *E. vulneris* amb una soca cadascuna.

Hi ha un total de 22 soques que no presenten cap resistència: *E. cloacae* i *P. agglomerans* (cinc soques cadascuna), *S. marcescens* (tres soques), *K. oxytoca* i *E. gergoviae* (dos soques), *E. coli*, *E. sakazakii*, *E. cancerogenus*, *St. maltophilia* i *L. adecarboxylata* (una soca cadascuna).

Si expressem les dades anteriors en percentatge, s'observa en les espècies amb un nombre significatiu d'aïllats, que *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* i *H. alvei* presenten el major percentatge de resistències front a dos antibiòtics (64,5%, 48%, 45,4% i 50%, respectivament), mentre que en el cas de *P. agglomerans*, *S. marcescens*, *E. sakazakii*, *C. freundii*, *Kl. ascorbata*, *E. cancerogenus*, i *E. coli*, el major percentatge de soques correpond a les que presenten una única resistència (47%, 33,3%, 62,5%, 50%, 66,7%, 60%, 75% i 50% respectivament). L'espècie amb més soques sensibles a tots els antibiòtics és *P. agglomerans* (29,4%), seguida de *S. marcescens*, *E. cancerogenus* i *E. coli* amb un 25%, mentre que les que mostren un menor percentatge de soques sensibles a tots els antibiòtics són *K. oxytoca* (8%), *E. cloacae* (6,6%), i *Kl. ascorbata*, *E. aerogenes*, *F. oryzihabitans*, *H. alvei*, *C. freundii* i *K. pneumoniae* amb un 0%. Finalment un 2,6% de

soques d'*E. cloacae* són resistents a cinc antibiòtics, mentre que les resistències a quatre antibiòtics s'observen en *C. freundii* i *S. marcescens* (16,7%), *E. sakazakii* (12,5%), *K. pneumoniae* (9,1%) i *P. agglomerans* (5,9%).

Si comparem l'IR₁₁, l'índex més alt el presenten *A. baumannii* (4) i *S. rubidaea* (3) (encara que aquesta dada no es representativa ja que sols hi ha una soca de cada espècie), seguit de *F. oryzihabitans* amb un 2,75 (amb quatre soques) i *E. cloacae* amb un 2,12, dada que és més representativa ja que correspon a 76 soques. Altres espècies amb un nombre significatiu de soques presenten un índex de 1,48 (*K. oxytoca*, 25 soques), 1,05 (*P. agglomerans*, 17 soques), 1,50 (*S. marcescens*, 12 soques), 1,91 (*K. pneumoniae*, 11 soques). Per tant, després d'*E. cloacae*, l'índex més alt correspon a *K. pneumoniae*, mentre que *P. agglomerans* presenta l'índex més baix (veure Taula 4.7 per més detalls). La comparació de l'índex relatiu (IRR) mostra el mateix patró.

Segons es mostra en la Taula 4.8, si fem la comparació per gèneres, trobem que dintre del gènere *Enterobacter* (n: 95) hi ha dos soques que presenten cinc resistències, quatre soques amb quatre resistències, 12 amb tres resistències, 52 amb dos resistències, 16 amb una resistència i nou amb cap resistència. En quant al gènere *Klebsiella* (n: 36) trobem una soca amb quatre resistències, dos amb tres resistències, 17 amb dos resistències, 14 amb una resistència i dos amb cap resistència. El gènere *Pantoea* (n: 17) presenta una soca amb quatre resistències, tres amb dos resistències, vuit amb una resistència i cinc amb cap resistència. El gènere *Serratia* (n: 15) presenta dos soques amb quatre resistències, una amb tres resistències, tres amb dos resistències, sis amb una resistència i tres amb cap resistència. El gènere *Kluyvera* (n: 8) sols presenta tres soques amb dos resistències i cinc amb una resistència. *Citrobacter* (n: 6) presenta una soca amb quatre resistències, dos amb dos resistències i tres amb una resistència. *Escherichia* (n: 5) presenta una soca amb dos resistències, tres amb una resistència i una sense resistències. *Flavimonas* (n: 4) presenta una soca amb quatre resistències, dos amb tres resistències i una amb una resistència. El gènere *Hafnia* (n: 4) presenta una soca amb tres resistències, dos amb dos resistències i una amb una resistència. *Pseudomonas* (n: 2) presenta dos soques amb dos resistències. L'única soca d'*Acinetobacter* (n: 1) presenta quatre resistències, i l'única soca de *Stenotrophomonas* (n: 1) no presenta resistències, al igual que la soca del gènere *Leclercia* (n: 1) que no presenta resistències.

Si comparem aquestes dades en percentatges en aquells gèneres amb un nombre significatiu d'aïllats, trobem un resultat similar al descrit per a les espècies. El gènere *Enterobacter* mostra un 54,7% d'aïllats resistents a dos antibiòtics, un 6,3% d'aïllats

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

resistents a quatre o cinc antibiòtics, mentre que sols el 9,5% van ser sensibles a tots els antibiòtics. Dintre del gènere *Klebsiella*, el 47,2% d'aïllats va ser resistents a dos antibiòtics, el 2,8% va mostrar quatre resistències i sols el 5,5% van ser sensible a tots els antibiòtics. Els gèneres *Pantoea*, *Serratia*, *Kluyvera*, *Citrobacter* i *Escherichia* van mostrar un major percentatge de soques resistents a un sol antibiòtic (47%, 40%, 62,5%, 50% i 60%, respectivament). En el gènere *Serratia* un 13,4% de les soques i en el gènere *Citrobacter* un 16,7% de les soques foren resistents a quatre antibiòtics (Taula 4.8).

Taula 4.8. Multiresistències per gèneres bacterians. S'indica el nombre d'aïllats per gènere i el nombre de resistències que presenten, així com el percentatge en cada cas. IR₁₁ (Índex de resistència front als 11 antibiòtics utilitzats); IRR (Índex relatiu de resistència).

Gènere	0	1	2	3	4	5	IR ₁₁	IRR
<i>Enterobacter</i> (n: 95)	9 (9,5%)	16 (16,8%)	52 (54,7%)	12 (12,6%)	4 (4,2%)	2 (2,1%)	1,81	0,164
<i>Klebsiella</i> (n: 36)	2 (5,5%)	14 (38,9%)	17 (47,2%)	2 (5,5%)	1 (2,8%)	0	1,61	0,146
<i>Pantoea</i> (n: 17)	5 (29,4%)	8 (47,0%)	3 (17,6%)	0	1 (5,9%)	0	1,06	0,096
<i>Serratia</i> (n:15)	3 (20,0%)	6 (40,0%)	3 (20,0%)	1 (6,6%)	2 (13,4%)	0	1,53	0,139
<i>Kluyvera</i> (n: 8)	0	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0	0	0	1,37	0,124
<i>Citrobacter</i> (n: 6)	0	3 (50,0%)	2 (33,3%)	0	1 (16,7%)	0	1,83	0,166
<i>Escherichia</i> (n: 5)	1 (20,0%)	3 (60,0%)	1 (20,0%)	0	0	0	1,00	0,091
<i>Flavimonas</i> (n: 4)	0	1 (25,0%)	0	2 (50,0%)	1 (25,0%)	0	2,75	0,25
<i>Hafnia</i> (n: 4)	0	1 (25,0%)	2 (50,0%)	1 (25,0%)	0	0	2,00	0,182
<i>Pseudomonas</i> (n: 2)	0	0	2 (100%)	0	0	0	2,00	0,182
<i>Acinetobacter</i> (n: 1)	0	0	0	0	1 (100%)	0	4,00	0,363
<i>Leclercia</i> (n: 1)	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas</i> (n: 1)	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0

Al comparar les dades dels gèneres segons l'IR₁₁ (índex de resistència front als 11 antibiòtics), s'observa que el gènere que presenta un major índex és *Acinetobacter* amb un índex de 4,00 (ja que sols té un aïllat i presenta quatre resistències), a continuació *Flavimonas* que presenta un índex de 2,75 (amb quatre aïllats), seguit de *Pseudomonas* amb un 2,00 (dos aïllats) i *Hafnia* també amb un 2,00 (quatre aïllats). Si comparem l'IR₁₁ dels gèneres amb més nombre d'aïllats, i per tant on la dada pot ser molt més representativa que els gèneres amb baix nombre d'aïllats, troben que el gènere

Enterobacter té un valor superior (1,81) al de *Klebsiella* (1,61), *Serratia* (1,53), *Kluyvera* (1,37) i *Pantoea* (1,06).

En els hospitals espanyols, inclosa la Comunitat Valenciana, ha hagut un augment significatiu en el percentatge de soques productores de BLEEs (beta-lactamases d'espectre estès) entre els enterobacteris, tal com *E. coli*, *K. pneumoniae* i espècies d'*Enterobacter*, observats en els últims anys (Cantón *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2003, 2005; Diestra *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2009, 2010; Seral *et al.*, 2010; Santos & Gobernado, 2011b; Zarb *et al.*, 2012; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013). Les penicil·lines i les cefalosporines de tercera generació han sigut considerades com antimicrobians d'importància crítica segons l'OMS (Collignon *et al.*, 2009). A més, la zona de regadiu de València és molt coneguda pels productes agrícoles frescos, encara que algunes pràctiques, tal com la de l'ús de fem com adob agrícola poden contribuir a la contaminació de les verdures amb bacteris resistents als antibiòtics.

Els aliments vegetals frescos també poden estar implicats en la transmissió d'espècies enteropatogèniques amb resistències (Boehme *et al.*, 2004; Takkinen *et al.*, 2005; Schwaiger *et al.*, 2011b; Kim & Gun-Jo, 2014; Zurfluh *et al.*, 2015). Varios factors expliquen aquest fenomen: (i) l'ús a escala industrial d'antibiòtics en ramaderia per a millorar la producció animal és molt important quantitativament, ja que per exemple, al voltant de la meitat dels antibiòtics que es produeixen en Estats Units s'usen amb aquesta finalitat, i a Europa la situació es semblant (Lipsitch *et al.*, 2002; Collignon & Angulo, 2006; Collignon *et al.*, 2009; Manges & Johnson, 2012; Garcia-Migura *et al.*, 2014), i (ii) l'ús de fem com adob agrícola, o el d'aigües contaminades amb matèria d'origen fecal com reg en plantacions agrícoles. Quan s'utilitza fem poden ser alliberats al medi ambient quantitats residuals d'antibiòtics i/o bacteris portadors de resistències (Chee-Sanford *et al.*, 2009). De fet, diferents estudis han descrit una elevada prevalença de resistències a antibiòtics en diferents tipus de fem utilitzats en agricultura, i conseqüentment en el sòl, productes vegetals i aigües superficials (McManus *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 2006; Sarmah *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2009; Martí *et al.*, 2013; Blaak *et al.*, 2014). D'aquesta manera, les plantes poden contaminar-se amb bacteris enteropatògens, o comensals intestinals, portadors de resistències, que són capaços de sobreviure i/o multiplicar-se en els vegetals, i per tant d'arribar al consumidor (Natvig *et al.*, 2002; Takkinen *et al.*, 2005; Heaton & Jones, 2008). Com exemple, hi ha que citar que durant un brot comunitari per *E. coli* O157 es va detectar una àmplia distribució de soques d'*E. coli* multiresistents com contaminants de productes vegetals comercialitzats (Phillips *et al.*,

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

1988). Altre factor que contribueix a l'aparició de bacteris resistents en vegetals és l'ús d'alguns antibiòtics per la prevenció de malalties bacterianes en plantes (Vidaver, 2002; Phillips *et al.*, 2004). Encara que no hi ha estudis epidemiològics rigorosos, no és descartable la contribució d'aquests factors en l'aparició de resistències en bacteris enteropatògens humans. A més, donat que existeix una especificitat entre soques d'enterobacteris i les seves preferències per diferents hostes animals, i que la majoria de resistències en soques humanes tenen un origen humà, per tant el vertader perill de la utilització d'antibiòtics en la producció ramadera és discutible i està baix estudi, devent comparar-se els beneficis i els perjudicis del mateix (Mathew *et al.*, 2007). Alguns autors han suggerit que l'ús d'antibiòtics nous en producció ramadera hauria de retardar-se fins que hagi acabat el període de la seva utilitat màxima en medicina humana (Lipsitch *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2004).

En qualsevol cas, la comercialització de productes vegetals frescos contaminats amb soques resistents representa un problema significatiu de salut pública, ja que pot originar infeccions de difícil tractament en el cas de que es tracte de bacteris enteropatògens, o bé de poder estendre la resistència a altres bacteris intestinals si es tracta de microorganismes comensals (Aarestrup *et al.*, 2008; Walsh & Fanning, 2008). Per últim, la manipulació d'aquests aliments en la cuina del propi consumidor pot representar una font de contaminació encreuada per a altres aliments.

L'ús d'agents antimicrobians en la cria d'animals, com factor de creixement, té un efecte selectiu en l'aparició i manteniment de bacteris resistents en els animals, productes d'origen animal i en el medi ambient; l'evidència mostra que els microorganismes resistents o els seus gens de resistència a antibiòtics es poden transferir des dels aliments, els animals i des del medi ambient als éssers humans (Lipsitch *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2004; Sarmah *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2013; García-Migura *et al.*, 2014).

Els resultats d'aquesta tesi indiquen que les espècies dels gèneres *Enterobacter* i *Klebsiella*, entre altres, estan presents en els productes vegetals frescos, i que durant el processament d'aquests productes per a preparar productes de quarta gamma llestos per menjar, la contaminació bacteriana no disminueix significativament, inclòs alguns bacteris es detecten en més quantitat, com és el cas d'*E. cloacae*. Aquesta observació concorda amb els resultats preliminars d'aquesta tesi (tal com s'ha mencionat abans) que indiquen que el rentat estàndard de les mostres vegetals amb aigua abans de l'anàlisi microbiològic no millora significativament el seu contingut d'enterobacteris, suggerint que aquestes espècies bacterianes posseeixen mecanismes d'adhesió a la superfície vegetal. Un resultat similar es

va descriure en un estudi sobre mostres d'enciam de restaurants de la Universitat de València, en el que la majoria de les mostres va ser positiva per la presència de bacteris coliformes, i no es van disminuir els coliformes totals després del rentat amb aigua; en canvi el tractament amb antimicrobians com el hipoclorit de sodi o el permanganat de potassi va reduir a la dècima part, almenys, la càrrega microbiana (Soriano *et al.*, 2000). La capacitat dels bacteris per adherir-se a la superfície dels vegetals o per internalitzar-se en els teixits vegetals (Brandl, 2006; Heaton & Jones, 2008; Tyler & Triplett, 2008) limita la utilitat del processament convencional per tractar els vegetals frescos, cosa que indica que la prevenció de la contaminació és molt important per controlar els brots associats amb el consum dels productes vegetals frescos. Com ja s'ha comentat abans, en la costa mediterrània espanyola, inclosa l'àrea de València, l'ús de fem com fertilitzant és una pràctica bastant comuna que pot contribuir a la contaminació del sòl, de l'aigua i per tant dels vegetals. Cal remarcar que en el nostre procediment experimental (la quantitat analitzada de cada mostra ha sigut de 3-5 grams) pot haver estimat a la baixa la prevalença d'enterobacteris en les mostres analitzades, ja que si s'hagueren processat mostres vegetals més grans (superior a 5 grams) probablement s'haguera obtingut un augment en el percentatge de les mostres positives, tenint en compte que la distribució dels bacteris en les superfícies vegetals és heterogènia i freqüentment la càrrega bacteriana es troba concentrada en les zones on es desenvolupen biofilms. En qualsevol cas, aquesta observació reforça els resultats descrits en aquest treball.

Cal indicar també que una majoria d'aïllats són resistents a antibiòtics àmpliament usats en clínica, tal com els beta-lactàmics amoxicil·lina/clavulànic i ampil·lina, mentre que les resistències a cefalosporines de tercera generació (cefotaxima i ceftazidima), que han sigut usades d'una manera molt més limitada, són infreqüents. El nostre estudi és el primer que descriu la presència de resistències a antibiòtics clínicament rellevants en enterobacteris en productes vegetals frescos en Espanya, particularment en la fèrtil àrea de València, coneguda per la seva producció agrícola. Com s'ha dit abans, els antibiòtics són àmpliament usats en la producció agrícola i ramadera (Lipsitch *et al.*, 2002, McManus *et al.*, 2002; Vidaver, 2002), cosa que condueix a la selecció de bacteris resistents, particularment en el tracte gastrointestinal dels animals; tan bacteris resistents com antibiòtics no absorbits són excretats pels animals en el fem i en els sistemes de recol·lecció de les escombraries de les granges (Blanco *et al.*, 2009; Venglovsky *et al.*, 2009). En conseqüència, l'aplicació de fem, una pràctica habitual en Espanya, inclosa l'àrea de València, i altres països incloent-hi Estats Units, o l'ús d'aigua de reg

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

contaminada, representen mitjans per l'entrada mediambiental tant d'antibiòtics com de determinants genètics de resistència al sòl i a les plantes; açò indica que qüestions que afecten a la contaminació mediambiental i transmissió de bacteris resistents a antibiòtics a través del fem procedent de la indústria ramadera deuen ser seriosament considerats i hi ha una necessitat per a millorar la regulació mediambiental que afecta a la producció i manipulació del fem (Nicholson *et al.*, 2005; Sarmah *et al.*, 2006; Aarestrup *et al.*, 2008; Chee-Sanford *et al.*, 2009; Venglovsky *et al.*, 2009).

D'altra banda els nostres resultats recolzen la idea de que la contaminació microbiana dels vegetals frescos amb patògens oportunistes tal com *E. cloacae* i *K. pneumoniae*, entre altres espècies, deu ser considerada com un problema de seguretat alimentària, especialment en persones debilitades o immunocompromeses per diferents causes, i també de que els productes vegetals frescos participen com a portadors de bacteris amb resistències des de les granges als consumidors (Takkinen *et al.*, 2005; Schwaiger *et al.*, 2011a, 2011b; Kim & Gun-Jo, 2014; Zurfluh *et al.*, 2015). Cal remarcar per la seva potencial rellevància clínica que varis aïllats d'*E. cloacae* mostren multiresistències a tres, quatre o cinc antibiòtics, cosa que confirma l'emergència de resistències dintre del complex *E. cloacae* i la seva disseminació mediambiental, també observada en altres aïllats d'espècies clínicament rellevants (*K. pneumoniae*, *P. agglomerans*, *E. sakazakii*, *F. oryzihabitans*, *C. freundii*, *S. marcescens* i *A. baumannii*, com s'ha indicat abans) que presenten resistència a tres o quatre quimioteràpics antibacterians (Martínez- Martínez & Calvo, 2010; Mezzatesta *et al.*, 2012; Tzouveleki *et al.*, 2012; Farinas & Martínez-Martínez, 2013; Sievert *et al.*, 2013). Tenint en compte que els bacteris que contenen determinants de resistència poden tenir una gran influència en la transferència dels gens de resistència en hàbitats naturals, com l'intestí humà que es considerat com un "hot spot" per la transferència horitzontal de gens entre bacteris (Heuer & Samalla, 2007; Kurokawa *et al.*, 2007; Aminov, 2011; Baquero, 2012; Baquero *et al.*, 2013), la presència de determinants de resistència a antibiòtics en espècies d'enterobacteris en productes vegetals frescos s'ha de considerar com un problema addicional de seguretat alimentària.

Encara que la possible relació entre els aïllats procedents de productes vegetals frescos i els aïllats clínics ha de ser encara inequívocament demostrada, hi ha algunes evidències que la suggereixen: (i) gens de resistència idèntics s'han trobat en espècies bacterianes Gram-negatives aïllades en tot el món a partir de mostres alimentàries (Peirano & Pitout, 2010; Vincent *et al.*, 2010; Peirano *et al.*, 2012), i (ii) bacteris saprofitics en productes frescos (convencionals i orgànics) contenen gens de resistència que s'han trobat també en

soques patogèniques de bacteris Gram-negatius disseminades internacionalment, cosa que suggereix que aquests productes poden servir com a reservoris de gens de resistència a antibiòtics que finalment poden ser transmesos a patògens humans (Raphael *et al.*, 2011). Un model paradigmàtic que mostra la gravetat de l'entrada d'espècies bacterianes patogèniques resistents a antibiòtics en la cadena alimentària està constituït pels enterobacteris resistents a carbapenems, que poden ser transmeses a través del consum d'aliments. Per tant, és molt important establir mètodes rutinaris d'anàlisi microbiològic d'aquests productes alimentaris, així com prendre decisions polítiques per a tractar aquest problema de salut pública.

El nostre estudi ha trobat diferències entre els productes vegetals cultivats convencionalment i els orgànics o ecològics, fonamentalment pel que fa a una menor contaminació per bacteris coliformes en aquests últims, que podrien ser degudes als mètodes de cultiu. No obstant això, el nivell general de contaminació en els dos tipus de productes es semblant, així com la freqüència de l'aparició de bacteris resistents als distints antibiòtics. Per tant, tots els aspectes comentats anteriorment sobre la necessitat de mesures de control a tots els nivells per tal d'evitar la contaminació microbiana dels productes vegetals frescos, són també aplicables als productes orgànics. A més, en aquest cas l'absència o baix contingut de bacteris resistents a antibiòtics deuria ser considerada com una propietat desitjable d'aquests productes, que podria conferir-los un valor afegit. Per tant, com a conseqüència dels nostres resultats es pot proposar: (i) quantificar la presència de bacteris resistents en els productes orgànics com un indicador de la seva qualitat, i (ii) incloure controls rutinaris dels productes vegetals frescos per a detectar bacteris resistents a antibiòtics, especialment les espècies patogèniques per tal de protegir al consumidor.

Finalment, la presència de resistències a antibiòtics i particularment les multiresistències en espècies d'*Enterobacter* i *Klebsiella* i altres gèneres (*Serratia*, *Pantoea*, *Kluyvera*, *Flavimonas*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia* i *Pseudomonas*) tal com s'ha descrit abans, en productes vegetals frescos recolza la seua utilitat per a servir com (i) indicadors de la disseminació de les resistències en el medi ambient, així com (ii) portadors de determinants de resistència des de les granges als consumidors, cosa que probablement contribueix a la disseminació de resistències a la microbiota comensal i/o patogènica a través de mecanismes de transferència horitzontal de gens. Encara que la participació d'aquest fenomen en la disseminació de resistències bacterianes en la comunitat ha de ser estudiada més a fons, la participació significativa dels productes vegetals frescos en la disseminació de resistències no s'ha de descartar, ja que

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

són productes que es consumeixen a nivell mundial durant tot l'any. A més, el consum d'antibiòtics, moltes vegades no ben controlat en la comunitat, s'ha de tenir en compte ja que pot afavorir la selecció de les resistències (Lázaro & Oteo, 2006). Aquesta qüestió ha de ser considerada com un problema silenciós de seguretat alimentària, ja que en la majoria de casos no afecta directament a la salut del consumidor (no causa malaltia o símptomes) però pot contribuir al problema creixent de les resistències als antibiòtics en bacteris Gram-negatius. Per tant, existeix la necessitat de millorar la qualitat higiènica dels productes frescos comercialitzats utilitzant millors mètodes per a prevenir la contaminació en origen (granges i camps de cultiu), incloent millores en la regulació mediambiental de la producció i manipulació de fem, l'ús de pràctiques higièniques eficients, tant en els llars com restaurants i cuines d'institucions públiques i privades (col·legis, centres de tercera edat, hospitals, etc.), així com mètodes adequats de manipulació des del camp als mercats, per minimitzar processos addicionals de contaminació bacteriana i/o de proliferació bacteriana en els productes vegetals frescos. En aquest sentit, cal destacar l'existència de programes europeus per monitoritzar la presència de resistències en bacteris presents en animals destinats a la producció d'aliments (Jong *et al.*, 2013). A més, els nostres resultats posen de manifest que seria molt útil incloure els productes vegetals frescos dintre de programes de vigilància epidemiològica per analitzar la disseminació de resistències bacterianes en el medi ambient i en la comunitat, fora de l'entorn hospitalari. En aquest sentit, cal indicar que alguns dels bacteris multiresistents detectats en el nostre estudi en productes vegetals frescos es corresponen amb espècies de bacteris multiresistents inclosos com a microorganismes sentinella utilitzats pel control hospitalari d'infeccions nosocomiales (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., i *A. baumannii*), tal com s'ha indicat en la taula 1.9 de l'apartat d'introducció d'aquesta tesi (Lopez-Cerero *et al.*, 2013).

5. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. No s'han detectat enterobacteris patògens en les productes vegetals frescos analitzats, encara que bona part d'ells (60% aproximadament, incloent tant productes convencionals, orgànics, de quarta gamma i amanides) tenen contaminació microbiana per enterobacteris. Les espècies aïllades pertanyen majoritàriament als gèneres *Enterobacter* i *Klebsiella* (70% aproximadament), entre altres (*Pantoea*, *Serratia*, *Kluyvera*, *Citrobacter*, etc.), i inclouen moltes espècies considerades patògens oportunistes.
2. La presència en els vegetals frescos, que són ingerits preferentment crus pel consumidor, de bacteris patògens oportunistes, presents com microbiota epifítica pròpia del vegetal, o com contaminants procedents del sòl o de fonts d'origen animal o humà, pot representar un risc potencial d'infecció pel consumidor, especialment si està immunodeprimit o debilitat.
3. Els productes de quarta gamma són els que presenten un major nivell de contaminació, el que indica que el processament dels vegetals per la seva comercialització com productes de quarta gamma no elimina eficaçment la seva contaminació bacteriana. L'adhesió dels bacteris a la superfície vegetal i la seva internalització en els teixits vegetals poden limitar la utilitat dels mètodes de processament i higienització dels productes de quarta gamma, així com minimitzar en general l'efecte del rentat sobre tot tipus de producte vegetal.
4. Des de el punt de vista de la seguretat alimentària, és aconsellable un major control de la càrrega microbiana dels productes vegetals frescos, i prendre mesures preventives per a evitar la contaminació d'aquests aliments en els camps de cultiu, especialment mitjançant el control de les aigües de reg i adobs d'origen animal com el fem.
5. Una majoria d'aïllats són resistents a antibiòtics àmpliament usats en clínica (com l'amoxicil·lina/clavulànic i l'ampicil·lina), mentre que les resistències a cefalosporines de tercera generació, i a altres antibiòtics és baixa, però significativa en alguns casos. Varis aïllats d'*Enterobacter cloacae* i altres d'espècies clínicament rellevants (*Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter sakazakii*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* i *Acinetobacter baumannii*) presenten multiresistència a tres, quatre o inclòs cinc quimioteràpics antibacterians.

CONCLUSIONS

6. El consum de productes vegetals frescos que es consumeixen directament sense tractament previ, representa una via d'entrada de bacteris resistents viables a l'intestí humà, on les resistències poden transmetre's fàcilment a altres microorganismes de la microbiota comensals i patogènica del consumidor. Aquesta qüestió ha de ser considerada com un problema silenciós de seguretat alimentària, ja que no afecta directament a la salut del consumidor, però pot contribuir al problema creixent de la disseminació en la comunitat de les resistències als antibiòtics en bacteris Gram-negatius.
7. La presència de bacteris resistents als antibiòtics es semblant en tots els tipus de productes vegetals analitzats, inclosos els orgànics o ecològics, pel que es pot proposar que l'absència o el baix nivell de bacteris resistents pugui considerar-se com una característica desitjable i un valor afegit dels productes ecològics.
8. Alguns dels bacteris multiresistents detectats en el nostre estudi (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., i *Acinetobacter baumannii*) es corresponen amb espècies incloses com a microorganismes sentinella utilitzats pel control hospitalari d'infeccions nosocomials per bacteris multiresistents, pel que seria molt útil incloure els productes vegetals frescos dintre de programes de vigilància epidemiològica per analitzar la disseminació de resistències bacterianes en el medi ambient i en la comunitat, fora de l'entorn hospitalari.

6. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P** (2008). Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **6**: 733-750.
- Alder JD** (2005). Daptomycin: a new drug class for the treatment of Gram-positive infections. *Drugs Today*, **41**: 81-90.
- Alonso R, Baquero F** (1994). The genus *Serratia*: its biology clinical effects and epidemiology. *Revista Clinica Española*, **194**: 294-299.
- Altun Koroglu O, Yalar M, Ozalkaya E, Polat DC, Akisu M, Kultursay N** (2010). *Kluyvera cryocrescens* sepsis in a preterm infant. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **3**: 195-196.
- Aminov RI** (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, **2**: 1-18.
- Amsden GW, Ballow CH, Bertino JS, Kashuba AD** (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, Vol.1 (Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds.), 7^a ed. Churchill Livingstone Elsevier, London, pp. 297-307.
- Andargie G, Kassu A, Moges F, Tiruneh M, Huruy K** (2008). Prevalence of bacteria and intestinal parasites among food-handlers in Gondar town, northwest Ethiopia. *Journal of Health Population and Nutrition*, **26**: 451-455.
- Antunes P, Machado J, Sousa JC, Pixe L** (2005). Dissemination of sulfanamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 836-839.
- Arslan U, Casar M, Tuncer I, Findik D** (2008). *Escherichia vulneris* peritonitis in a patient on CAPD. *Peritoneal Dialysis International*, **28**: 681-682.
- Bachman MA, Breen P, Deomellas V, Mu Q, Zhao L, Wu W et al.** (2015). Genome-wide identification of *Klebsiella pneumoniae* fitness genes during lung infections. *MBio*, **6**(3): e00775.doi: 10.1128/mBio.00775-15.
- Ball AP, Bartlett JG, Craig WA, Drusano GL, Felmingham D, Garau JA et al.** (2004). Future trends in antimicrobial chemotherapy: expert opinion on the 43rd ICAAC. *Journal of Chemotherapy*, **16**: 419-436.
- Baquero F** (2012). Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**: 67-73.
- Baquero F, Cantón R** (2009). Evolutionary biology of drug resistance. In: *Antimicrobial drug resistance* (Mayers DL, eds.), Humana Press, London, pp. 9-32.
- Baquero F, Tedim AP, Coque TM** (2013). Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Frontiers in Microbiologia*, **4**:1-15.

BIBLIOGRAFIA

- Barak JD, Gorski L, Naraghi-Arani P, Charkowsk AO** (2004). *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 5685-5691.
- Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C** (2009). Current status of newer carbapenems. *Current Medicinal Chemistry*, **16**: 564-575.
- Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M** (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**: 493-496.
- Belal M, Al-Mariri A, Hallab L, Hamad I** (2013). Detection of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from medicinal plants and spices in Syria. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **7**: 82-89.
- Beltran A, Molinero AV, Capilla S, Polo AM** (2004). Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from wound exudates of a diabetic patient. *Medicina Clinica*, **122**: 159.
- Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D et al.** (2014). New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro surveillance*, **19**(20).pii: 20809.
- Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L et al.** (2013). Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLOS One*, **8**(4): e61428.doi: 10.1371/journal.pone.006.
- Beuchat LR** (1999). Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *Journal of Food Protection*, **62**: 845-849.
- Bhatawadekar SM** (2013). Community-Acquired urinary tract infection by *Pseudomonas oryzihabitans*. *Journal of Global Infectious Diseases*, **5**: 82-84.
- Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM** (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **10**: 917-934. doi:10.1586/eri.12.78.
- Blaak H, van Hoek AH, Veenman C, Docters van Leeuwen AE, Lynch G, van Overbeek WM et al.** (2014). Extended spectrum B-lactamase-and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural. *International Journal of Food Microbiology*, **168**: 8-16.
- Blair R** (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics and the aging kidney. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **5**: 314-327.
- Blair R** (2011). *Organic Production and Food Quality A Down to Earth Analysis*. Wiley-Blackwell, Oxford (UK).
- Blanco G, Lemus JA, Grande J** (2009). Microbial pollution in wildlife: linking agricultural manuring and bacterial antibiotic resistance in red-billed coughts. *Environmental Research*, **109**: 405-412.

- Boehme S, Werner G, Klare I, Reissbrodt R, Witte W** (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*, **48**: 522-531.
- Bonamonte D, Belloni Fortina A, Neri L, Patrizi A** (2014). Fusidic acid in skin infections and infected atopic eczema. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, **149**: 453-459.
- Bouwer H, Idelovitch E** (1987). Quality requirements for irrigation with sewage water. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, **113**: 516-535.
- Boyer A, Amadeo B, Vargas F, Yu M, Maurice-Tison S, Dubois V et al.** (2011). Severe Community-acquired *Enterobacter pneumonia*: a plea for greater awareness of the concept of health-care-associated pneumonia. *BioMed Central Infectious Diseases*, **11**: 120 doi: 10.1186/1471-2334-11-120.
- Brandl MT** (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, **44**: 367-392.
- Brandl MT, Mandrell RE** (2002). Fitness of *Salmonella enterica* Serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*, **68**: 3614-3621.
- Brandl MT, Millar WG, Bates AH, Mandrell RF** (2005). Production of autoinducer 2 in *Salmonella enterica* serovar Thompson contributes to its fitness in chickens but not on cilantro leaf surfaces. *Applied Environmental Microbiology*, **71**: 2653-2662.
- Brink AJ, Feldman C, Grolman DC, Muckart D, Pretorius J, Richards GA et al.** (2004). Appropriate use of the carbapenems. *South African Medical Journal*, **94**: 857-861.
- Burnett SL, Beuchat LR** (2001). Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Ecology*, **27**: 104-110.
- Bush K** (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33**: 259-263.
- Bush K** (2012). Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Current Opinion in Pharmacology*, **12**: 527-534.
- Bush K, Jacoby GA** (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**: 969-976.
- Butikofer S, Dettori JM, Vemulakonda GA, Slabaugh M** (2013). *Enterobacter cloacae* postsurgical endophthalmitis; Report of a positive outcome. *Case Reports in Ophthalmology*, **4**: 42-45.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B et al.** (2011). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *P. aeruginosa* from blood stream infections:

BIBLIOGRAFIA

Prevalence and linkage to resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 1906-1911.

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M et al. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europa. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**: 413-431.

Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela MN, Pérez-Díaz JC, Baquero F (2002). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 1237-1243.

Cantón R, Alós JI, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J et al. (2007). Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad *in vitro* con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad *in vitro* con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **25**: 394-400.

Cantón R, Loza E, Baquero F (2011). Principios básicos de la farmacoterapia antiinfecciosa: concepto de sensibilidad y de resistencia, CMI y FC/FD. Mecanismos de resistencia. Selección y uso racional de antimicrobianos. En: *Terapéutica Farmacológica de los trastornos infecciosos y parasitarios sistémicos*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid. pp. 5-17.

Cantón R, Coque TM, Baquero F (2006a). Evolución y perspectivas futuras de la resistencia a los antimicrobianos. En: *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, (Auxina Ruiz, Moreno Gullén S, eds.), Madrid: Editorial Médica Panamericana, pp. 167-178.

Cantón R, Morosini MI, Valdezate S (2006b). Resistencia a los antimicrobianos. En: *Antimicrobianos en medicina*. (García-Rodríguez JA, García-Sánchez JE, Gobernado M, Picazo JJ, Prieto J, eds.) Barcelona: Prous Science, pp. 35-81.

Carrero P, Garrote JA, Pacheco S, García AI, Gil R, Carbajosa SG (1995). Report of six cases of human infection by *Serratia plymuthica*. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**: 275-276.

Carter MQ, Brandl MT, Louie JW, Kyle JL, Carychao DK, Cooley MB et al. (2011). Distinct acid resistance and survival fitness displayed by curli variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 3685-3695.

Civljak R, Giannella M, Di Bella S, Petrosillo N (2014). Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens? A review of *in vitro* data in the literature from the 21st century. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **12**: 249-264.

Clay KD, Hanson JS, Pope SD, Rissmiller RW, Purdum PP 3rd, Banks PM (2006). Brief communication: severe hepatotoxicity of telithromycin: three case reports and literature review. *Annals of Internal Medicine*, **144**: 415-420.

Collignon P, Angulo FL (2006). Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*: food for thought. *Journal of Infectious Diseases*, **194**: 8-10.

Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FK (2009). World Health Organization Ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Food Safety*, **49**: 132-141.

Colodner R (2005). Extended-spectrum beta-lactamases; a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *American Journal of Infection Control*, **33**: 104-107.

Conway WS, Leverentz B, Saftner RA, Janisiewicz WJ, Sams CF, Leblanc F (2000). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices, and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease*, **84**: 177-181.

Cooley MB, Chan D, Mandrell RE (2006). *Escherichia coli* O157:H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection*, **69**: 2329-2335.

Cox ER, Nayak SU, Kuruppu JC (2013). *Klebsiella oxytoca* bacteremia-causal relationship to symptomatic colitis? *International Journal of Infectious Diseases*, **17**(6):e472-3. doi: 10.1016/j.ijid.2013.02.003.

Craig WA, Ebert SC (1990). Killing and regrowth of bacteria *in vitro*: a review. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplementum*, **74**: 63-70.

Cuéllar S (2006). Antibacterianos betalactámicos. En: *Avances en Farmacología y Farmacoterapia. Módulo VIII: Farmacología de las Enfermedades Infecciosas y Parasitarias*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, Madrid, pp. 39-100.

Cuéllar S (1996). Antibióticos betalactámicos. En: *Introducción a la Química de los Medicamentos*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, Madrid, pp. 7-18.

Cuéllar S (2011). Aspectos farmacológicos de los antibacterianos. En: *Terapéutica farmacológica de los trastornos infecciosos y parasitarios sistémicos*. Ed: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, BGA Asesores. Madrid, pp. 33-86.

Cusimano A, Husserl FE (1997). *Flavimonas oryzihabitans* peritonitis in CAPD. *Peritoneal Dialysis International*, **17**: 406-407.

Chawla K, Vishwanath S, Gupta A (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* in lower respiratory tract infections. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **8**: 20-22.

Chee-Sanford LC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC et al. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*, **38**: 1086-1108.

BIBLIOGRAFIA

- D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J et al.** (2011). Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 2735-2742.
- Davidson GR, Buchholz AL, Roser ET** (2013). Efficacy of commercial produce sanitizers against nontoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 during processing of iceberg lettuce in a pilot-scale leafy green processing line. *Journal of Food Protection*, **76**: 1838-1845.
- Daza Perez RM** (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, **22**: 57-67.
- De la Cruz F, Davies J** (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, **8**: 128-133.
- Demir T, Baran G, Buyukgudu T, Sezgin FM, Kaymaz H** (2014). Pneumonia due to *E. cancerogenus* infection. *Folia Microbiologica*, **59**: 527-530.
- Denton M** (2007). *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **29**: 9-22.
- Díaz MA, Hernández JR, Martínez L, Rodríguez J, Pascual A, and Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEHI)** (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE Project, 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **27**: 503-510.
- Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J et al.** (2010). Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: Second nationwide study. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 2840-2845.
- Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J et al.** Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) (2008). Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **26**: 404-410.
- Domingo D, Limia A, Alarcon T, Sanz JC, del Rey MC, López-Brea M** (1994). Nosocomial septicemia caused by *Serratia plymuthica*. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**: 575-577.
- Dong Y, Iñiguez AL, Ahmer BMM, Triplett EW** (2003). Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonisation by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *M. truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 1783-1790.
- Donnenberg MS, Whittam TS** (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, **107**: 539-548.

- Drelichman V, Band JD** (1985). Bacteremias due to *Citrobacter diversus* and *Citrobacter freundii*. Incidence, risk factors, and clinical outcome. *Archives of Internal Medicine*, **145**: 1808-1810.
- Drinkwater LE** (2009). Ecological knowledge Foundation for sustainable organic agriculture. In: *Organic Farmings The Ecological System, Agronomy Monograph 54*, (Francis C.A. ed.). American Society of Agronomy, crop Science Society of America, Soil Science Society of America. Madison (WI), pp. 19-47.
- Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X** (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**: 385-392.
- Drlica K, Zhao X** (2007). Mutant selection window hypothesis updated. *Clinical Infection Diseases*, **44**: 681-688.
- Drusano GL** (2004). Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of “bug and drug”. *Nature Reviews Microbiology*, **2**: 289-300.
- DuPont HL** (2007). The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, **45**: 1353-1361.
- Edson RS, Terrell CL** (1999). The aminoglycosides. *Mayo Clinic Proceeding*, **74**: 519-528.
- Enya J, Shinohara H, Yoshida S, Tsukiboshi T, Negishi H, Suyama K et al.** (2007). Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microbial Ecology*, **54**: 524-536.
- Everis L** (2004). Risks of Pathogens in Ready-to-eat Fruits Vegetables, and Salads Through the Production Process. Chipping Campden, UK: Review no. 44, Campden and Chorleywood Food Research Association Group.
- Falagas ME, Giannopoulon KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI** (2008a). Fosfomicin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clinical Infectious Diseases*, **46**: 1069-1077.
- Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, Matthaion DK, Hsueh PR** (2008b). Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62**: 889-894.
- Fariñas MC, Martínez-Martínez L** (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 402-409.
- Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J et al.** (2013). Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: Segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIP-Ab 2010). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 4-9.

BIBLIOGRAFIA

Fett WF (2000). Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *Journal of Food Protection*, **63**: 625-632.

Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ (2010). Antibiotic and Chemotherapy. 9th ed. Edimburgo: Saunders Elsevier. 2011.

Fisher J, Rodriguez I, Schmogen S, Friese A, Roesler U, Helmuth R et al. (2013). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 478-480.

Forsythe SJ, Dickins B, Jolley KA (2014). *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *E. sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. *BioMed Central Genomics*, **15**: 1121.

Frampton JE, Curran MP (2005). Tigecycline. *Drugs*, **65**: 2623-2635.

Fujita J, Negayama K, Ohara M, Hojo S, Obayashi Y, Miyawaki H et al. (1998). Pneumonia caused by *Pseudomonas putida* with a mucoid phenotype. *Respiratory Medicine*, **92**: 693-695.

Fukuta Y, Muder RR, Agha ME, Clarke LG, Wagener MM, Hensler AM et al. (2013). Risk factor to acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among cancer patients. *American Journal of Infection control*, **41**: 1249-1252.

Gagliardi JV, Farns JS (2002). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environmental Microbiology*, **4**: 89-96.

Gamón M, Saez E, Gil J, Boluda R (2003). Direct and indirect exogenous contamination by pesticides of rice-farming soils in a Mediterranean wetland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 141-151.

Ganeswire R, Thong KL, Puthuchery SD (2003). Nosocomial outbreak of *Enterobacter gergoviae* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, **53**: 292-296.

García-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, **170**: 1-9.

Gaston MA (1988). *Enterobacter*: An emergent nosocomial pathogen. *Journal of Hospital Infection*, **11**: 197-208.

Gentile D, Perez M, Centelles MJ (2014). Bacteremia by a *Serratia rubidaea* with an atypical quinolones resistance phenotype. *Revista Chilena de Infectología*, **31**: 351-352.

Geser N, Stephan R, Hächler H (2012). Occurrence and characteristic of extended-spectrum B-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BioMed Central Veterinary Research*, **8**:21.

- Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiene R, Pavilonis A** (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, **47**: 137-146.
- Gilbert DN, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM, Sande MA** (eds.) (2006). The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy, 34th ed. Hyde Park, VT, USA.
- González F, Muñoz I, Vanaclocha H** (2008). Real time information. A necessary tool in epidemiological surveillance. *Gaceta Sanitaria*, **22**: 162-167.
- Gootz TD** (2004). Global dissemination of beta-lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenems. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **2**: 317-327.
- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D et al.** (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLOS Pathogens*, **7**: e1002158.
- Guo X, Chen J, Brackett RE, Beuchat LR** (2001). Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 4760-4764.
- Guo X, van Iersel MW, Chen J, Brackett RE, Beuchat LR** (2002). Evidence of association of *Salmonellae* with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 3639-3643.
- Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR** (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Food Microbiology*, **104**: 1-34.
- Guskey MT, Tsull BT** (2010). A comparative review of the lipoglycopeptides: oritavancin, dalbavancin and telavancin. *Pharmacotherapy*, **30**: 80-94.
- Hall RG, Michaels HN** (2015). Profile of tedizolid phosphate and its potential in the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections. *Infection and Drug Resistance*, **8**: 75-82.
- Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G** (2006). Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 3284-3290.
- Han X, Du XD, Southey L, Bulach DM, Seemann T, Yan XX et al.** (2015). Functional analysis of a bacitracin resistant determinant located on ICECp1, a novel Tn916-like element from a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pii: AAC.01643-15.
- He S, He H, Chen Y, Chen Y, Wang W, Yu D** (2015). *In vitro* and *in vivo* analysis of antimicrobial agents alone and in combination against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, **6**: 507. doi:10.3389/fmicb.2015.00507.ecollection2015.

BIBLIOGRAFIA

Heaton JC, Jones K (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, **104**: 613-626.

Henson KE, Levine MT, Wong EA, Levine DP (2015). Glycopeptide antibiotics: evolving resistance, pharmacology and adverse event profile. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **12**: 1-14.

Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L. Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) (2003). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de beta-lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **21**: 77-82.

Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Spanish Group for Nosocomial Infections (2005). *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: A nationwide study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 2122-2125.

Heuer OE, Hammerum AM, Collignon P, Wegener HC (2006). Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clinical Infectious Diseases*, **43**: 911-916.

Heuer H, Smalla K (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety*, **6**: 3-13.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated to healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **29**: 996-1011.

Ho J, Tambyah PA, Paterson DL (2010). Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **23**: 546-553.

Holy O, Forsythe S (2014). *Cronobacter* spp. As emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, **86**: 169-177.

Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, Sköld O (1995). Trimethoprim and sulphonamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 279-289.

Hutchinson D, Barday M, Prescott WA, Brown J (2013). Inhaled aztreonam lysine: an evidence-based review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **14**: 2115-2124.

Hutchison ML, Walters LD, Moore A, Crookes KM, Avery SM (2004). Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 5111-5118.

Iguchi A, Nagaya Y, Pradel E, Ooka T, Ogura Y, Katsura K et al. (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome Biology and Evolution*, **6**: 2096-2110.

Ikram R, Psutka R, Certer A, Priest P (2015). An outbreak of multi-drug resistant *Escherichia coli* urinary tract infection in an elderly population: a case-control study of risk factors. *BioMed Central Infectious Diseases*, **15**: 224.

Iñiguez AL, Donh Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplett EW (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonisation by plant defences. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, **18**:169-178.

Islam M, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X (2004a). Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, **67**: 1365-1370.

Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X (2004b). Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 2497-2502.

Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X (2004c). Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens and Disease*, **1**: 27-35.

Iuchi S, Lin EC (1991). Adaptation of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression. *Cell*, **66**: 5-7.

Jacobs JL, Sundin GW (2001). Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 5488-5496.

Jacoby GA (2009). AmpC betalactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, **22**: 161-182.

James A, McKinnell MD, Nicholas S, Stollenwerk MD, Chin W, Jung MD et al. (2011). Nitrofurantoin compares favourably to recommended agents as empirical treatment of uncomplicated urinary tract infections in a decision and cost analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, **86**: 480-488.

Joanne MW, Ho MD, David N, Juurlink MD PhD (2011). Considerations when prescribing trimethoprim-sulfamethoxazole. *Canadian Medical Association of its licensors*, **186**: 1851-1858.

Johnson LM, Jaykus LA, Moll D, Anciso J, Mora B, Moe CL (2006). A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International Journal of Food Microbiology*, **112**: 83-95.

Jong A, Thomas V, Klein U, Marion H, Moyaert H, Simjee S et al. (2013). Pan-European resistance monitoring programmes encompassing food-borne bacteria and target

BIBLIOGRAFIA

pathogens of food-producing and companion animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **41**: 403-409.

Kaneko KI, Hayashidani H, Ohtomo Y, Kosuge J, Kato M, Takahashi K et al. (1999). Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. *Journal of Food Protection*, **62**: 644-649.

Karaiskos I, Giamarellou H (2014). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **15**: 1351-1370.

Kärpänoja P, Nyberg ST, Bergman M, Voipio T, Paakkari P, Huovinen P et al. (2008). Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe Network). Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**: 2480-2485.

Kataria A, Saad E (2015). Severe peritonitis caused by *Citrobacter freundii* and successful treatment with double antibiotic coverage. *Indian Journal of Nephrology*, **25**: 117-118.

Kazancioglu R, Buyukaydin B, Iraz M, Alay M, Erkoç R (2014). An unusual cause of peritonitis in peritoneal dialysis patients: *Pantoea agglomerans*. *Journal Infection in Developing Countries*, **8**: 919-922.

Keam SJ (2008). Doripenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*, **68**: 2021-2057.

Keren Y, Keshet D, Eidelman M, Geffen Y, Raz-Pasteur A, Hussein K (2014). Is *Leclercia adecarboxylata* a New and Unfamiliar Marine Pathogen? *Journal of Clinical Microbiology*, **52**: 1775-1776.

Keyman Y, Rubinstein E (2007). The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **30**: 385-89.

Kim ES, Hooper DC (2014). Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **46**: 226-238.

Kim S, Gun-Jo W (2014). Prevalence and Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Organic Vegetables. *Foodborne Pathogens and Disease*, **11**: 815-821.

Klugman KP, Lonks JR (2005). Hidden epidemic of macrolide-resistant pneumococci. *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 802-807.

Kluytmans J, Price L, Grayson L, Gotthieb T, Mehtar S, Andreumont A et al. (2013). Enterobacteria: Ban resistant strains from food chain. *Nature*, **501**: 31.

Koziaz WP, Veall J, Sandhu N, Kumar P, Hoecher B, Lambert IB (1998). Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of

resistance to 5-nitrofurantoin derivatives in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **180**: 5529-5539.

Kudva IT, Blanch K, Hovde CJ (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 3166-3174.

Kurokawa K, Itho T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A et al. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*, **14**: 169-181.

Kwon DH, Lee M, Kim JJ, Kim JG, El-Zaatari FAK, Osato MS et al. (2001). Furazolidone- and Nitrofurantoin-resistant *Helicobacter pylori*: prevalence and role of genes involved in metronidazole resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 306-308.

Labar AS, Millman JS, Ruebush E, Opintan JA, Bishar RA, Oladipo Aboderin A et al. (2012). Regional dissemination of a trimethoprim-resistance gene cassette via a successful transposable element. *PLOS One*, **7**(5): e38142. doi:10.1371/journal.pone.0038/42.

Lavigne JP, Defez C, Bouziges N, Mahamat A, Sotto A (2007). Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Citrobacter* spp. Infections in a French university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **26**: 439-441.

Lázaro E, Oteo J (2006). Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, **30**: 10-19.

Levi SB, Marshall B (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, **10**: S122-S129.

Li XZ, Nikaido H (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, **69**: 1555-1623.

Lin RD, Hsueh PR, Chang JC, Teng LJ, Chang SC, Ho SW et al. (1997). *Flavimonas oryzihabitans* bacteremia: clinical features and microbiological characteristics of isolates. *Clinical Infectious Diseases*, **24**: 867-873.

Linden PK (2008). Vancomycin resistance: are there better glycopeptides coming? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **6**: 917-928.

Linderberg M (2012). Genome-enabled perspectives on the composition, evolution, and expression of virulence determinants in bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **50**: 111-132.

Lindow SF, Brandl MT (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 1875-1883.

Lipsitch M, Singer RA, Levin BR (2002). Antibiotics in agriculture: when is it time to close the door? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**: 5752-5754.

BIBLIOGRAFIA

- Logan LK** (2012). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging problem in children. *Healthcare Epidemiology*, **55**: 852-859.
- López-Cerero L** (2014). Papel del ambiente hospitalario y los equipamientos en la transmisión de las infecciones nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **32**: 459-464.
- López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Pascual A** (2013). El laboratorio de Microbiología en la vigilancia y el control de las infecciones nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 44-51.
- López-Ibáñez C, Vidal Verdú E, Rivero A, Torre-Cisneros J** (2010). Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores (I): *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Serratia marcescens* y otros. *Medicine*, **10**: 3475-3481.
- López-Larramona G, Gomez de Oña E, Maestre-Muñiz MM, Ruiz-Chicote AM, Galan-Dorado E, Gonzalez-Delgado L** (2013). *Kluyvera ascorbata* bacteremia in an adult patient. *Revista Española de Quimioterapia*, **26**: 226-227.
- Loza E, Baquero F, Cantón R** (2006). Macrólidos, estólidos, lincosamidas y estreptograminas. En: *Avances en Farmacología y Farmacoterapia. Módulo VIII: Farmacología de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España; Madrid, pp. 123-148.
- Lund BM** (2014). Microbiological food safety and a low-microbial diet to protect vulnerable people. *Foodborne Pathogens and Disease*, **11**: 413-424.
- Lynch JP 3rd, Clark NM, Zhanel GG** (2013). Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum B-lactamases and carbapenemases). *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **14**: 199-210.
- Lynch MF, Tauxe RV, Hedberg CW** (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, **137**: 307-315.
- MacGowan AP** (2008). Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62**: 195-214.
- Madigan TM, Martinko JM, Dunlop PV, Clark DP** (2009). Broock, Biología de los Microorganismos, 12^a ed. Pearson Education SA, Madrid.
- Maguire AJ, Brown DFJ, Gray JJ, Desselberger U** (2001). Rapid screening technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1022-1029.
- Mahlen SD** (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clinical Microbiology Reviews*, **24**: 755-791.

- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R** (2010). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol.1, 7^a ed. Churchill Livingstone Elsevier, London.
- Mandrell RF, Gorski L, Brandl MT** (2006). Attachment of microorganisms to fresh produce. In: *Microbiology of Fruits and Vegetables*, (GM Sapers, JR Gomy, AF Yousef & Boca Raton, eds.), FL: CRC Press. Pp. 33-73.
- Manges AR, Johnson JR** (2012). Foodborne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clinical Infectious Diseases*, **55**: 712-719.
- Manzano D, Rojo P, Zubero Z, Alvarez M, Santamaria JM, Cisterna R** (1991). Polymicrobial bacteremia caused by *E. gergoviae* and *C. albicans*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **9**: 186-187.
- Marcos F, Albo MI, Arbol F, Casallo S, Duran A** (2005). Lower respiratory tract infection due to *Enterobacter gergoviae*. *Anales de Medicina Interna*, **22**: 553-554.
- Martí R, Scott A, Tien Y, Murray R, Sabourain L, Zhang Y et al.** (2013). The impact of manure fertilization and the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied Environmental Microbiology*, **79**: 5701-5709.
- Martín M, Gudiol F** (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **21**: 42-55.
- Martínez-Martínez L, Calvo J** (2010). The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **28**: 25-31.
- Martínez-Martínez A, Pascual R, Cantón R** (2013). El Comité Español del Antibiógrama (COESANT), en sintonía con EUCAST. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 639-640.
- Mathew AG, Cissell R, Liamthong S** (2007). Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathogens and Disease*, **4**: 115-133.
- Matthews K, Doyle M** (2006). Microbiology of Fresh Produce. ASM Press, Washington.
- McKinnon PS, Davis SL** (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the treatment of bacterial infectious diseases. In: *Antimicrobial therapy and vaccines*, (Lu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C, Morse GD, eds.). Vol II. Antimicrobial agents. 2^a ed. Pittsburgh: ESun Technologies LLC. pp. 3-19.
- McLachlan AJ, Pont LG** (2012). Drug metabolism in older people, a key consideration in achieving optimal outcomes with medicines. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **67**: 175-180.
- McManus PS, Stockwell VO, Sudin GW, Jones AL** (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 443-465.

BIBLIOGRAFIA

Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, **7**: 887-902.

Moellering RC, Eliopoulos GM (2010). Principles of anti-infective therapy. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, (Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds.), 7^a ed. Churchill Livingstone Elsevier, London, pp. 267-278.

Mohanty S, Chandra SP, Dhawan B, Kapil A, Das BK (2005). Meningitis due to *Escherichia vulneris*. *Neurology India*, **53**: 122-123.

Monier JM, Lindow SE (2005). Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. *Microbial Ecology*, **49**: 343-352.

Montagnani C, Cocchi P, Lega L, Campana S, Biermann KP, Braggion C et al. (2015). *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role of implementing hand hygiene among external consultants. *BioMed Central Infectious Diseases*, **15**: 11. doi:10.1186/s12879-014-0734-6.

Moody MN, Morrison LK, Tyring SK (2010). Retapamulin: what in the role of this topical antimicrobial in the treatment of bacterial infectious in atopic dermatitis? *Skin Therapy Letter*, **15**: 1-4.

Moonah S, Deonarine K, Freeman C (2010). Multidrug resistant *Kluyvera ascorbata* septicemia in an adult patient: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, **4**: 197. doi:10.1186/1752-1947-4-197.

Morris CE, Monier JM (2003). The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **41**: 429-453.

Morris CE, Monier JM, Jacques MA (1998). A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4789-4795.

Mouton JW, Ambrose PG, Cantón H, Drusano GL, Harbarth S, Macgowan A et al. (2011). Conserving antibiotics for the future: new ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Drug Resistance Updates*, **14**: 107-117.

Moyaert H, de Jong A, Simjee S, Thomas V (2014). Antimicrobial resistance monitoring projects for zoonotic and indicator bacteria of animal origin: common aspects and differences between EASSA and EFSA. *Veterinary Microbiology*, **171**: 279-283.

Muñoz I, Vanaclocha H, González F (2007). La importancia de las redes microbiológicas en el control de las resistencias bacterianas. RedMIVA, *Revista Española de Quimioterapia*, **20**: 193-202.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2014). *Microbiología Médica*, 7^a Ed. Elsevier España, Barcelona.

- Natvig EE, Ingham SC, Ingham BH, Cooperband LR, Roper TR** (2002). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2737-2744.
- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B** (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **29**: 524-534.
- Navarro F, Miró E, Mirelis B** (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **28**: 638-645.
- Nei T, Sonobe K, Onodera A, Itabashi T, Yamaguchi H, Maeda M et al.** (2015). Two cases with bacteremia suspected to be due to relatively rare *Pseudomonas (Flavimonas) oryzihabitans*. pii: S1341-321X(15)00144-0 doi:10.1016/j.jiac.2015-06.005.
- Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN** (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, **395**: 559-575.
- Nicholson EA, Groves SJ, Chambers BJ** (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, **96**: 135-143.
- Nogueira JM** (2011). Los sistemas de vigilancia microbiológica para la gestión de las resistencias. Un ejemplo en la Comunitat Valenciana con RedMIVA. *Viure en Salut*, **88**: 8-9.
- Nordmann P** (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **44**: 51-56.
- Núñez M** (2006). Tetraciclinas, Anfenicoles, Aminoglucósidos, Oxazolidinonas. En: *Avances en Farmacología y Farmacoterapia, Módulo VIII: Farmacología de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Madrid, pp. 101-122.
- Oliveira M, Usall J, Viñas I, Anguera M, Gatiús F, Abadías M** (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, **27**: 679-684.
- Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blázquez J** (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, **288**: 1251-1254.
- Oteo J, Campos J** (2003). Valor de los sistemas de vigilancia de Resistencia a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **21**:123-125.
- Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P et al.** (2014a). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **32**: 666-670.

BIBLIOGRAFIA

- Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F** (2014b). Evolution of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at the global and nacional level: What should be expected in the future? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **32**: 17-23.
- Otto M** (2012). MRSA virulence and spread. *Cellular Microbiology*, **14**: 1513-1521.
- Paez JI, Costa SF** (2008). Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *Journal of Hospital Infection*, **70**: 101-108.
- Page MGP, Heim J** (2009). New molecules from old classes: revisiting the development of beta-lactams. *Drugs*, **12**: 561-565.
- Palomino J, Pachón J** (2003). Aminoglicosidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **22**: 195-115.
- Pancoast SJ** (1988). Aminoglicoside antibiotics in clinical use. *Medical Clinics of North America*, **72**: 581-612.
- Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR et al.** (2009). Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends in Immunology*, **30**: 325-333.
- Patel JB, Gorwitz RJ, Jernigan JA** (2009). Mupirocin resistance. *Clinical Infectious Diseases*, **49**: 935-941.
- Paterson DL** (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine*, **34**: S20-28.
- Peirano G, Pitout JD** (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25: H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**: 316-321.
- Peirano G, Sang JHK, Pitondo-Silva A, Lanpland KB, Pitout JD** (2012). Molecular epidemiology of extended-spectrum-B-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* over a 10 year period in Calgary, Canada. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**: 1114-1120.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL** (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**: 538-582.
- Phillips I, Eykyn S, King A, Gransden WR, Rowe B, Frost JA et al.** (1988). Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth Health District. *Lancet*, **1**: 1038-1041.
- Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R et al.** (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**: 28-52.

Pigrau C (2013). Infecciones del tracto urinario nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 614-624.

Pires SM, Vieira AR, Hald T, Cole D (2014). Source attribution of human Salmonellosis: an overview of methods and estimates. *Foodborne Pathogens and Disease*, **11**: 667-676.

Polage CR, Solnick JV, Cohen SH (2012). Nosocomial diarrhea: evaluation and treatment of causes other than *Clostridium difficile*. *Clinical Infectious Diseases*, **55**: 982-989.

Pollack S (2001). Consumer demand for fruit and vegetables: the U.S. example. In: *Changing Structure of Global Food Consumption and Trade*. (Regmi A, ed.) Washington, DC: Economic Research Service/United States Department of Agriculture, publication n°. WRS01-1, pp. 49-54.

Poovelikunnel T, Gethin G, Humphreys H (2015). Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**: 2681-2692.

Principi N, Esposito S (2013). Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: its role in respiratory infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 506-511.

Pujol M, Limón E (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 108-113.

Quirce F, Freire MA (2011). Resistencia a los antibióticos : perspectiva desde la atención primaria. *Viure en salut*, **88** : 13-14.

Raffi F, Hansen EB Jr (1998). Isolation of Nitrofurantoin-resistant mutants of Nitroreductase-producing *Clostridium* sp. Strains from the human intestinal tract. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 1121-1126.

Rahube TO, Marti R, Scott A, Tien YC, Murray R, Sabourin L et al. (2014). Topp E. Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**: 6898-6907.

Raphael E, Wong LK, Riley LW (2011). Extended-spectrum beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Applied Environmental Microbiology*, **77**:1601-1607.

Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ (2014). Fluoroquinolone resistance mechanisms, impact in bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, **22**: 438-445.

Redmiva (2011). Informe de resistencias, febrero 2011. Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Área de Epidemiología. Dirección General de Salud Pública. Conselleria de Sanidad. Generalitat Valenciana.

BIBLIOGRAFIA

Reffert JL, Smith WJ (2014). Fosfomicin for the treatment of resistant gram-negative bacterial infections. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*, **34**: 845-857.

Rice LB (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, **197**: 1079-1081.

Richards GM, Beuchat LR (2005). Infection of cantaloupe rind with *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium expansum* and associated migration of *Salmonella poona* into edible tissues. *International Journal of Food Microbiology*, **103**: 1-10.

Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y (2012). Emergence of metallo-beta-lactamase GIM-1 in a clinical isolate of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**: 4945-4947.

Riley PA, Threlfall EJ, Cheasty T, Wooldridge KG, William PH, Phillips I (1993). Occurrence of Flme plasmids in multiply antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. *Epidemiology and Infection*, **110**: 459-468.

Riordan DC, Sapers GM, Annous BA (2000). The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of *Penicillium expansum* and *Glomerella cingulata* in wounds on apple surfaces. *Journal of Food Protection*, **63**: 1637-1642.

Roberts MC (2008). Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, **282**: 147-159.

Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, Fresco G, Navarro-San Francisco C, Gudiol C et al. for the Study Group of Nosocomial Infections (GEIH) of the Spanish Society of Infectious Diseases, Infectious Diseases (SEIMC) (2015). Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **33**: 1-21.

Rodríguez-Guardado A, Boga JA, de Diego I, Ordás J, Alvarez ME, Perez F (2000). Clinical characteristics of nosocomial and community acquired extraintestinal infections caused by *Hafnia alvei*. *Scandinavian Journal of Infections Diseases*, **9**: 708-710.

Rodríguez-Martínez JM, Conejo MC, Díaz de Alba P, López-Cerero L, Fernandez-Echauri P, Pascual A (2012). Asociación en un mismo plásmido de blaVIM-1 y qnrS2 en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas en Sevilla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **30**: 246-248.

Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, Collmer A (2002). HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana devalandii* seedlings. *Proceeding of the National Academy Sciences USA*, **99**:13142-13147.

Ruiz de Alegría C, Rodríguez-Baño J, Cano ME, Hernández-Bello JR, Calvo J, Román E et al. (2011). *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-

- lactamases in Spain: Microbiological and clinical features. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 1134-1136.
- Rybak MJ** (2004). Resistance to antimicrobial agents: an update. *Pharmacotherapy*, **24**: 203S-215S.
- Sahl JW, Sistrunk JR, Fraser CM, Hine E, Baby N, Begur Y et al.** (2015). Examination of the Enterotoxigenic *Escherichia coli* population structure during human infection. *MBio*, **6**(3):e00501. doi:10.1128/mBio.00501-15.
- Sahuquillo JM, López A, Armero C, Perpiñán H, González F, Selva M** (2011a). *Escherichia coli*: una línea de investigación a partir de los datos de la red de vigilancia microbiológica de la Comunitat Valenciana (RedMIVA). *Viure en Salut*, **88**: 10-12.
- Sahuquillo JM, Selva M, Perpiñán H, Gobernado M, Armero C, López-Quílez A et al.** (2011b). Antimicrobial resistance in more than 100,000 *Escherichia coli* isolates according to cultura site and patient age, gender, and location. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 1222-1228.
- Samonis G, Vouloumanon EK, Christofaki M, Dimopoulou D, Maradi S, Triantafyllon E et al.** (2011). *Serratia* infections in a general hospital: characteristics and out comes. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **30**: 653-660.
- Santamaría J, Toranzos GA** (2003). Enteric pathogens and soil: A short review. *International Microbiology*, **6**: 5-9.
- Santos M, Gobernado M** (2011a). Las resistencias bacterianas asociadas a la asistencia sanitaria. *Viure en Salut*, **88**: 6-7.
- Santos M, Gobernado M** (2011b). Síndrome de la infección relacionada con la asistencia sanitaria (IRAS). En: *Enfoque Clínico de los grandes síndromas infecciosos*, (Gomez J, Gobernado M, ed. Ergon), 4ª Ed., capítulo 40, Majadahonda, Madrid.
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB** (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*, **65**: 725-759.
- Sarria JC, Vidal AM, Kimbrough RC 3rd** (2001). Infections caused by *Kluyvera* species in humans. *Clinical Infectious Diseases*, **33**: 69-74.
- Satlin MJ, Jenkins SG, Chen L, Helfgott D, Feldman EJ, Kreiswirth BN** (2013). Septic shock caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacter gergoviae* in a neutropenic patient with leukemia. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 2794-2796.
- Scangarella-Oman NE, Shawar RM, Bouchillon S, Hoban D** (2009). Microbiological profile of a new topical antibacterial: retapamulin ointment 1%. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **7**: 269-279.

BIBLIOGRAFIA

- Scheinfeld N** (2004). Telithromycin a brief review of a new ketolide antibiotic. *Journal of Drugs in Dermatology*, **3**: 409-413.
- Schwaiger K, Helmke K, Hölzel CS, Bauer JA** (2011b). Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal of Food Microbiology*, **148**: 191-196.
- Schwaiger K, Helmke K, Hölzel CS, Bauer JA** (2011a). Comparative analysis of the bacteria flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. *International Journal of Environmental Health Research*, **21**:161-172.
- Segado A, Alonso A, Lubián SP, García AM** (2012). *Pantoea agglomerans*: ¿un nuevo patógeno en la unidad de cuidados intensivos neonatales? *Archivos Argentinos de Pediatría*, **110**: 77-79.
- Sekhsokh Y, Avsalane L, El Quenass M, Doublali T, Bajjon T, Lahlon Amine I** (2007). *Serratia rubidaea* bacteremia. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **37**: 287-289.
- Seral C, Pardos M, Castillo FJ** (2010). Extended-spectrum beta-lactamases other than *Escherichia* and *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **28**:12-18.
- Seymour IJ, Appleton II** (2001). A review, foodborne viruses and fresh produce. *Journal of Applied Microbiology*, **91**:759-773.
- Shah PM** (2005). The need for new therapeutic agents: what is the pipeline? *Clinical Microbiology and Infection*, **11**: 36-42.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM** (2010). Aging of the innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, **22**: 507-513.
- Shaw KJ, Poppe S, Schaadt R, Brown-Driver V, Finn J, Pillar CM et al.** (2008). *In vitro* activity of TR-700, the antibacterial moiety of the prodrug TR-701, against linezolid-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**: 4442-4447.
- Shi S, Klotz U** (2011). Age-related changes in pharmacokinetics. *Current Drug Metabolism*, **12**: 601-610.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A et al.** (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **34**: 1-14.
- Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV** (2004). Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, **67**: 2342-2353.
- Smith DL, Harris AD, Johnson JA, Silvergeld EK, Morris JG** (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**: 6434-6439.

- Smith-Spangler C, Brandeau ML, Hunter GE, Bavinger JC, Pearson M, Eschbach PJ et al.** (2012). Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives? A systematic review. *Annals of Internal Medicine*, **157**: 348-366.
- Solomon EB, Matthews KR** (2006). Interaction of live and dead *Escherichia coli* O157:H7 and fluorescent microspheres with lettuce tissue suggest bacterial processes do not mediate adherence. *Letter in Applied Microbiology*, **42**: 88-93.
- Solomon EB, Pang HJ, Matthews KR** (2003). Persistence of *Escherichia coli* O157; H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. *Journal of Food Protection*, **66**: 2198-2202.
- Solomon EB, Yaron S, Matthews KR** (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalisation. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 397-400.
- Solomon EB, Brandl MT, Mandrell RE** (2006). Biology of food-borne pathogens on produce. In: *Microbiology of Fresh produce* (Matthews K, Doyle M, eds.), ASM Press, Washington, pp. 55-83.
- Soriano F** (2010). Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la lectura interpretada del antibiograma. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **28**: 461-466.
- Soriano JM, Rico H, Moltó JC, Mañes J** (2000). Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International Journal of Food Microbiology*, **58**: 123-128.
- Soriano JM, Rico H, Moltó JC, Mañes J** (2001). Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants, *Food Microbiology*, **18**: 159-163.
- Stanic M, Mensburger E, Hartmann G, Laotta K** (2015). *Hafnia alvei* urosepsis in a kidney transplant patient. *Case Reports in Transplantation*. 2015:863131. doi:10.1155/2015/863131.Epub2015Apr15.
- Stanley K, Jones K** (2003). Cattle and sheep farms as a reservoir of *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology*, **94**: 104s-113s.
- Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP** (2005). Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55**: 283-288.
- Stein GE, Craig WA** (2006). Tigecycline: a critical analysis. *Clinical Infectious Diseases*, **43**: 518-524.
- Stopforth JD, Ikeda JS, Kendall PA, Stofos JN** (2004). Survival of acid-adapted or nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds and surrounding tissue following chemical treatments and storage. *International Journal of Food Microbiology*, **90**: 51-61.

BIBLIOGRAFIA

Su DM, Aw D, Palmer DB (2013). Immunosenescence: a product of the environment? *Current Opinion in Immunology*, **25**: 498-403.

Suárez C, Gudiol F (2009). Betalactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **27**: 116-129.

Sukupolvi S, Lorenz RG, Gordon JI, Bian Z, Pfeifer JD, Normark SJ et al. (1997). Expression of thin aggregative fimbriae promotes interaction of *Salmonella typhimurium* SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, **65**: 5320-5325.

Takkinen J, Nakari UM, Johansson T, Niskanen T, Siitonen A, Kuusi M (2005). A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella typhimurium* in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005. *Euro surveillance*, **10** (6):E050630.1.

Tängdén T, Giske CG (2015). Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of Internal Medicine*, **277**: 501-512.

Tauxe RV (1997). Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, **3**: 425-434.

Tenover FC (2001). Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clinical Infectious Diseases*, **33**: 108-115.

Tenover FC (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in Bacteria. *American Journal of Infection Control*, **34**: 3-10.

Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W (2008). Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 3080-3083.

Torres AG, Jeter C, Langley W, Matthyse AG (2005). Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 8008-8015.

Towner KJ, Pearson NJ, Pinn PA, O'Grady F (1980). Increasing importance of plasmid-mediated trimethoprim resistance in enterobacteria: two six-month clinical surveys. *British Medical Journal*, **280**: 517-519.

Tsuda H, Yamashita Y, Shibata Y, Nakano Y, Koga T (2002). Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 3756-3764.

Tuon FF, Scharf C, Rocha JL, Cieslinsk J, Becker GN, Arend LN (2015). KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. *The Brazilian Journal of Infections Diseases* **19**: 324-327.

Tyler HL, Triplett EW (2008). Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **46**: 53-63.

- Tyrell SR, Knox JW, Weatherhead EK** (2006). Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, **69**: 2029-2035.
- Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL** (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, **25**: 682-707.
- Uche A** (2008). *Pantoea agglomerans* bacteriemia in a 65-years-old man with acute myeloid leukaemia: case report and review. *Southern Medical Journal*, **101**: 102-103.
- Uhlich GA, Keen JE, Elder RO** (2002). Variations in the csgD promoter of *Escherichia coli* O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of Hep-2 cells. *Infection and Immunity*, **70**: 395-399.
- Vakulskas CA, Potts AH, Babitzke P, Ahmer BM, Romeo T** (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **79**: 193-224.
- Van Bambeke, F** (2014). Renaissance of antibiotics against difficult infections. Focus on oritavancin and new ketolides and quinolones. *Annals of Medicine*, **46**: 512-529.
- Van Bambeke F, Van Laethem Y, Courvalin P, Tulkens PM** (2004). Glycopeptide antibiotics: from conventional molecules to new derivatives. *Drugs*, **64**: 913-936.
- Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK** (2015). Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clinic Proceedings*, **90**: 395-403.
- Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J** (2010). Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**: 1898-1916.
- Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J** (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiology*, **8**: 711-724.
- Venglovsky J, Sasakova N, Placha I** (2009). Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresource Technology*, **100**: 5386-5391.
- Vicente D, Pérez-Trallero E** (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **28**: 122-130.
- Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C et al.** (2010). Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, **16**: 88-95.
- Vidaver AK** (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*, **34**: S107-S110.

BIBLIOGRAFIA

- Vijayakrishnan R, Kouser J, Abraham C** (2010). *Serratia rubidaea* as a rare cause of gram-negative bacteremia. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, **18**: 336-337.
- Walsh F** (2013). The multiple roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*. **4**:255. doi:10.3389/fmicb.2013.00255. eCollection2013.
- Walsh F, Duffy B** (2013). The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PLOS One*. **8**(6):e65567. doi:10.1371/journal.pone.0065567.
- Walsh C, Fanning S** (2008). Antimicrobial resistance in foodborne pathogens: a cause for concern? *Current Drugs Targets*, **9**: 808-815.
- Wang JL, Tang HJ, Hsieh PH, Chiu FY, Chen YH, Chang MC et al.** (2012). Fusidic acid for the treatment of bone and joint infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **40**: 103-107.
- Weber JT, Courvalin P** (2005). An emptying quiver: antimicrobial drugs and resistance. *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 791-793.
- Weinstein RA** (1991). Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. *American Journal of Medicine*, **91**: 179S-184S.
- Wellington K, Curran MP** (2004). Ceftidoren pivoxil: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*, **64**: 2597-2618.
- Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ** (2009). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*, 7ªed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Yahav D, Paul M, Fraser A, Sarid N, Leibovici L** (2007). Efficacy and safety of cefepime: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, **7**: 338-348.
- Yan Q, Fanning S** (2015). Strategies for the identification and tracking of Cronobacter species: an opportunistic pathogen of concern to neonatal health. *Frontiers in Pediatrics*, **5**: 3-38.
- Yoshio Y, Kitazawa T, Kamimura M, Tatsuno K, Ota Y, Yotsuyanagi H** (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **17**: 278-282.
- Zaragozá F, Fernández del Pozo MB, Díez LM** (2006). Quinolonas, sulfamidas, nitroderivados y otros antibacterianos. En: *Avances en Farmacología y Farmacoterapia. Módulo VIII: Farmacología de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Madrid pp. 149-170.
- Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerkhoven V, Weist K et al.** (2012). The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro surveillance* **17**(46). pii: 20316.

Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens; a critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **60**: 1296-1215.

Zhanel GG, Johanson C, Embil JM, Noreddin A, Gin A, Vercaigne L et al. (2005). Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **3**: 23-39.

Zhanel GG, Karlowsky JA, Rubinstein E, Hoban DJ (2006). Tigecycline: a novel glycylyccline antibiotic. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **4**: 9-25.

Zhao T, Clavero MRS, Doyle MP, Beuchat LR (1997). Health relevance of the presence of fecal coliforms in iced tea and leaf tea. *Journal of Food Protection*, **60**: 215-218.

Zurfluh K, Nüesch-Inderbilen M, Morach M, Bemer AZ, Hächler H, Stephan R (2015). Extended-spectrum B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand and Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**: 3115-3120.