



universidad
de león

facultad
de veterinaria



Tesis Doctoral

Resistencia a antimicrobianos y persistencia
microbiana en la industria alimentaria:
factores de riesgo y reservorios ambientales.

Autor

Adrián Álvarez Molina

Directores

Avelino Álvarez Ordóñez
Mercedes López Fernández

Programa de doctorado

Ciencias veterinarias y de los alimentos

León 2021

Los doctores Avelino Álvarez Ordóñez y María Mercedes López Fernández, como directores de la tesis doctoral titulada “Resistencia a antimicrobianos y persistencia microbiana en la industria alimentaria: factores de riesgo y reservorios ambientales.” realizada por Adrián Álvarez Molina, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa en la modalidad por compendio de publicaciones.

Firmado en León, a 10 de noviembre de 2021

Avelino Álvarez Ordóñez

M. Mercedes López Fernández

El autor de esta tesis doctoral ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador (referencia: BES-2017-079753), encuadrada en el proyecto titulado "Identificación de rutas y mecanismos de transmisión de resistencia a antibióticos a través de la cadena alimentaria mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo" (referencia: AGL2016-78085-P), ambos financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Agradecimientos

Escribir y realizar los trabajos recopilados en esta Tesis Doctoral ha sido todo un desafío. Y, al igual que los alpinistas dependen de su equipo para coronar la cumbre, siento que de no ser por vosotros y vosotras no habría conseguido ni por asomo acabar con éxito este reto.

Aunque sepáis que os agradezco muchísimo todo vuestro tiempo, atención, ayuda y cariño, quiero dejarlo también plasmado en estas palabras. Porque “las palabras vuelan, y lo escrito permanece”.

Las primeras personas que me habéis dado el apoyo y la valentía para embarcarme en esta aventura, ante si quiera de saberlo yo mismo, habéis sido vosotras dos. Mi padre Pedro Luis y mi pareja Irina, gracias por celebrar y disfrutar mis éxitos conmigo, y ayudarme a levantarme tras los fracasos y dificultades. Más allá de este agradecimiento verbal, tened por seguro que haremos la debida celebración, o celebraciones, porque anda que no os he dado la tabarra estos años. Os quiero muchísimo y sé que os alegráis un montón por mí. Contáis con todo mi apoyo para vuestros futuros proyectos y desafíos.

A lo largo de los años que ha durado esta Tesis ha habido muchos momentos en los que perderse, pero he tenido la gran suerte de teneros como directores y acabar llegando a buen puerto. Gracias a mis directores de Tesis, Avelino Álvarez Ordóñez y Mercedes López Fernández por acompañarme y guiarme durante estos años. Gran parte de lo que he aprendido, investigado, publicado y mejorado ha sido gracias a vuestros consejos, paciencia y directrices.

Las muchas horas de laboratorio y meseta han sido mucho más llevaderas gracias a teneros cerca como compañeros de laboratorio. José, Coral, Paula, Dina, Alba, Alejandro, Rebeca, Amal, Vincenzo. Ha sido un lujo compartir con vosotros, además de lugar de trabajo e interés por la ciencia, cervezas, tapas, scape rooms, meriendas y cenas. Os deseo lo mejor en los próximos años y poder celebrar con vosotros vuestros éxitos.

Quiero también agradecer a las personas del departamento de “Higiene y Tecnología de los Alimentos” de la Universidad de León por el buenísimo ambiente que tenéis. Gracias a Bernardo, Leticia, Montserrat, Chema, María Eugenia, Marcia, Ángel, Julio, Avelino y Merche, por hacerme sentir parte de este fantástico equipo.

No todo el rato lo he pasado en el laboratorio, también hubo muchas horas de estar sentado en la oficina y tecleando en el ordenador, y he tenido la gran suerte de tener una maravillosa compañera de oficina. Gracias por ayudarme, saludarme, y reírte conmigo en el día a día Leticia.

Salir de lo conocido siempre nos pone a prueba. Gracias por ayudarme a superar esa prueba durante estancia que hice con vosotras en el centro CIBIR de La Rioja. Fue genial compartir y aprender durante dos meses sobre qué es la bioinformática con M², María de Toro y María Escudero. Siempre os agradeceré por enseñarme un poquito de ese mundo tan misterioso y complejo que es la bioinformática.

Por supuesto, hablar con otras personas que pasaban por lo mismo que yo ha sido de gran ayuda, gracias por vuestra labor psicológica y por ser compañeros de fatigas en la distancia. Oscar (si tú, el calomelánico), Carles, Neus, Héctor, Oscar (cántabro) y Saskia.

Sin duda las dos os merecéis una mención especial. Me visteis y dirigisteis cuando estaba acabando las prácticas de mi carrera, y nunca se me olvidará el mes de prácticas que estuve con vosotras en el IPLA cuando no sabía ni coger una micropipeta. Vuestra vocación, Beatriz Martínez y Clara Rocés, me ha dejado huella. Fue fantástico conoceros y descubrir con vosotras lo bonito que puede ser la investigación.

Aunque nos veamos cada vez menos, cada verano y navidad ese tiempo se difumina al volveros a encontrar. Es una alegría disfrutar con vosotros y también tenéis mi agradecimiento por vuestro interés y por todos los buenos ratos que hemos pasado estos años. A mis amigos: Elena, Alberto, Cristina, Alba, Aurora, Nicolás, Antonio y Helena

Índice

Abreviaturas	3
Resumen	9
1. Introducción	17
1.1. Resistencia a antimicrobianos: concepto y mecanismos de resistencia	19
1.2. El problema sanitario de la resistencia a antimicrobianos	21
1.3. Hacia una respuesta global: el plan de acción contra la AMR	21
1.3.1. Vigilancia en la Unión Europea y en España	23
1.3.2. El enfoque One Health, la resistencia a antimicrobianos más allá del hospital	27
1.3.3. La cadena alimentaria, la ruta de la granja a la mesa	30
1.4. Persistencia bacteriana en ambientes industriales, un escoyo para el control de la AMR en la cadena alimentaria	31
1.4.1. Riesgo del procesado de alimentos para la dispersión de AMR en la cadena alimentaria	33
1.4.2. Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain.	35
1.5. Técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos: un cambio de paradigma en seguridad alimentaria	39
1.5.1. Presente y futuro de la secuencia masiva del genoma (WGS) y secuenciación masiva de metagenoma (WMS) para el control de microorganismos resistentes y de genes de resistencia a antimicrobianos en la cadena alimentaria	41
1.5.2. The Present and Future of Whole Genome Sequencing (WGS) and Whole Metagenome Sequencing (WMS) for Surveillance of Antimicrobial Resistant Microorganism and Antimicrobial Resistance Genes across the Food Chain	43
2. Justificación y objetivos	47
3. Resultados	51
Capítulo I	53
Capítulo II	57

Capítulo III.....	61
Capítulo IV.....	65
Capítulo V.....	69
4. Discusión general.....	73
4.1. La vigilancia de las resistencias a antimicrobianos en la cadena alimentaria.....	75
4.2. Retos de la cadena alimentaria en cuanto a la monitorización de la AMR.....	75
4.3. Biocidas y técnicas de conservación de alimentos y su relación con la AMR.....	76
4.4. Efecto de las condiciones de estrés en la transferencia horizontal de AMR.....	79
4.5. Persistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en ambientes de procesado de alimentos.....	83
4.6. Estudio de las dinámicas temporales en el microbioma y resistoma industriales.....	88
4.7. Estudio del microbioma y resistoma de distintas industrias alimentarias de los sectores cárnico y lácteo.....	94
5. Conclusiones.....	101
6. Bibliografía.....	107
7. Anexos.....	129

Abreviaturas

Abreviaturas

ABR	Antibiotic resistance
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGISAR	Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance.
AMR	Antimicrobial resistance
ARG	Antimicrobial resistance gen
AST	Antimicrobial susceptibility testing.
AVMA	American Veterinary Medicine Association
CEN	European Committee for Standardization
CIA	Critically important antimicrobials
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ESAC-Net	European Surveillance Antimicrobial Consumption Network
ECDC	European Centre for Disease prevention and Control
EEC	European Economic Community
EFSA	European Food Safety Authority
EU	European Union
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase

Abreviaturas

ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAO	Food and Agriculture Organization.
FDA	Food and Drug Administration
GAP-AMR	Global Action Plan Antimicrobial Resistance.
ICGA	Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance
ISO	International Organization for Standardization
JACRA	Joint Inter-Agency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis
NGS	Next generation sequencing
NHGRI	National Human Genome Research Institute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NTAP	Non thermal atmospheric plasma
OIE	World Organisation for Animal Health
QAC	Quaternary ammonium compounds
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms

Abreviaturas

STAG Strategic and Technical Advisory Group on AMR

STEC Shiga toxin-producing *E. coli*

Abreviaturas

Resumen

Resumen

En 1945 se concedió el premio Nobel en Medicina al doctor Alexander Fleming por el descubrimiento de la penicilina, una molécula capaz de inhibir el crecimiento bacteriano que tomó su nombre del género del moho productor (*Penicillium*). Aunque apenas se había comercializado este antibiótico, en el discurso pronunciado durante la ceremonia de entrega del premio el Dr. Fleming pronunciaba de forma premonitoria la siguiente frase: **“Puede que llegue el momento en que la penicilina pueda ser comprada por cualquiera en las tiendas. Existirá entonces el peligro de que el ser humano pueda fácilmente no medicarse con dosis suficientes, y exponga así a sus microbios a cantidades no letales del antibiótico, lo que los hará resistentes...”**.

Tan solo 76 años tras la pronunciación de estas palabras, el panorama descrito por Fleming se ha hecho realidad. La resistencia a los antibióticos ha sido declarada por diversas organizaciones internacionales, incluyendo la *World Health Organization* (WHO) y la *Food and Agriculture Organization* (FAO), como uno de los principales retos a los que se enfrentará la humanidad en el siglo XXI.

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo general ampliar el conocimiento sobre los riesgos asociados a la transmisión de resistencias a antimicrobianos a través de la cadena alimentaria. Para alcanzar este objetivo principal se han realizado cinco trabajos experimentales. En los dos primeros (**capítulos I y II**) se pretendió responder a la pregunta: ¿Puede la exposición a condiciones de estrés a las que son sometidas las bacterias durante los procesos de conservación de alimentos o higienización de superficies favorecer la aparición y diseminación de resistencias a antimicrobianos?

En el **capítulo I** de la Tesis Doctoral el trabajo de investigación realizado se centró en analizar si dos nuevas tecnologías de descontaminación alternativas a los agentes desinfectantes de origen químico, la luz ultravioleta (UV) y el plasma atmosférico no térmico (NTAP), podían, al igual que algunos biocidas, ejercer una presión selectiva que favorezca la aparición de resistencias a antibióticos de importancia clínica cuando son aplicadas cíclicamente de manera subletal a cultivos de 12 cepas de bacterias patógenas de transmisión alimentaria (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp.). Se evaluaron 174 combinaciones de bacteria/tecnología/antibiótico, aislándose variantes resistentes a antibióticos de importancia clínica en 12 de ellas, la mayoría frente a antibióticos que actúan a nivel de la síntesis proteica (aminoglucósidos, tetraciclinas o gliciliclinas) o de la replicación del ADN (fluoroquinolonas). Sin embargo, no se detectaron variantes con susceptibilidad reducida frente antibióticos β -lactámicos. Tratando de indagar más profundamente en las posibles causas de los fenotipos resistentes a antibióticos, se secuenció el genoma de las 4 variantes resistentes obtenidas para *Salmonella* spp., y se identificaron mutaciones en los

Resumen

genes que codifican para algunas de las dianas celulares de actuación de dichos antibióticos (por ejemplo, el gen *gyrA* en variantes resistentes a ciprofloxacina, o el gen *rpsL* en una variante resistente a estreptomicina), acompañadas de polimorfismos en los genes que codifican para algunos reguladores de respuesta al estrés y transportadores de membrana probablemente involucrados en la expulsión no selectiva de antibióticos.

En el **capítulo II** se desarrolló y validó un protocolo rápido y sencillo de conjugación bacteriana que permite cuantificar en medio líquido tasas de transferencia horizontal entre dos cepas de *E. coli* de un plásmido de 193 kilobases que contiene un gen de resistencia a antibióticos β -lactámicos de espectro extendido (*bla*_{CTX-M-14}). Posteriormente, se empleó dicho protocolo para evaluar si la exposición a condiciones de estrés a las que se ven sometidos frecuentemente los microorganismos en la industria alimentaria (concentraciones residuales de biocidas, cambios de pH y/o de temperatura) podían incrementar las tasas de transferencia horizontal de este plásmido. En condiciones control (en caldo de cultivo de laboratorio, a pH neutro y temperatura óptima), la tasa media de conjugación, calculada dividiendo el número de transconjugantes por el número de bacterias receptoras, fue de $2,09 \times 10^{-4}$, produciéndose la captación del plásmido en 1 de cada 4.785 células bacterianas receptoras. Las tasas de conjugación se vieron reducidas a temperaturas de 20 y 30°C, en comparación con 37°C, y en medios de pH alcalino (pH 8,0 y 9,0, en comparación con pH 5,0, 6,0 y 7,0). Por otra parte, el efecto ejercido por la presencia de biocidas a concentraciones residuales dependió de la naturaleza del agente utilizado. El ácido peracético no modificó las tasas de conjugación, mientras el cloruro de benzalconio inhibió la conjugación por completo y el hipoclorito sódico la fomentó. Por último, se comprobó que el protocolo de conjugación también permitía obtener transconjugantes en leche, con similares tasas de transferencia horizontal a las observadas en medios de laboratorio en condiciones control.

Los **capítulos III-V** de la Tesis Doctoral se han desarrollado con la colaboración de varias industrias alimentarias, la mayoría de la provincia de León, que han permitido la realización de muestreos ambientales en sus instalaciones. En ellos se pretendió responder a la pregunta: ¿Cuál es la abundancia de microorganismos resistentes a antimicrobianos y de determinantes de resistencia a los antibióticos en la industria alimentaria, a qué categorías pertenecen los que aparecen con mayor frecuencia y cuáles son los principales reservorios y modos de dispersión de microorganismos persistentes y resistentes a antimicrobianos en los ambientes de procesado de alimentos?

En el **capítulo III** se llevó a cabo un estudio longitudinal, de año y medio de duración, sobre la colonización y persistencia de *L. monocytogenes* en ambientes de procesado de una industria cárnica recién construida. Se analizaron 229 muestras ambientales y se aislaron 18

Resumen

cepas de *L. monocytogenes*, que fueron estudiadas mediante secuenciación del genoma completo. Se observó un incremento a lo largo del tiempo en la frecuencia de aislamiento de *L. monocytogenes* y en su diversidad genotípica. Aunque las cepas aisladas pertenecieron a seis *sequence type* (ST) diferentes (ST8, ST9, ST14, ST37, ST121 y ST155), el genotipo ST9 fue el más abundante (8 de 18 cepas). Se encontraron muy pocos polimorfismos entre dos pares de cepas del ST9 aisladas en ambos casos con 3 meses de diferencia en la misma sala de trabajo, lo que sugirió que se trataba de cepas persistentes. Se identificaron 4 genes de resistencia a antibióticos, así como genes relacionados tanto con la virulencia como con tolerancia a estrés. Doce de los dieciocho aislados contenían un plásmido, que variaba en tamaño de 4 a 87 kilobases y albergaba genes de supervivencia a estrés y determinantes de resistencia a metales pesados y biocidas. Se identificaron plásmidos idénticos o muy similares para varios aislados del ST9, lo que apunta a que la expansión clonal y la persistencia de cepas del ST9 podría estar mediada por plásmidos. Finalmente, la comparación del genoma de los aislados del ST9 con 352 genomas de este mismo ST disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mostró la existencia de diferencias filogenéticas entre aislados europeos y norteamericanos. La comparación de los 12 plásmidos encontrados con 48 plásmidos de referencia portados por *L. monocytogenes* y disponibles en la base de datos del NCBI permitió observar agrupaciones de plásmidos característicos de genotipos frecuentemente implicados en fenómenos de persistencia en industrias alimentarias (ST9 y el ST121).

El **capítulo IV** se desarrolló en la misma industria cárnica recién construida, en paralelo a las actividades del capítulo III. Se realizaron muestreos ambientales a lo largo de año y medio de actividad en 10 visitas independientes. En total, se recogieron 1374 hisopos de múltiples superficies de la industria, que se agruparon en 229 muestras compuestas que fueron analizadas mediante secuenciación metagenómica total. Además, a partir de estas muestras ambientales, se construyó una colección de 360 aislados de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterococcaceae* y *Staphylococcaceae* que fueron posteriormente caracterizados para detectar la presencia de fenotipos y genotipos asociados con la resistencia a antibióticos de importancia crítica. Los análisis metagenómicos mostraron que la diversidad α (número de genes de resistencia o de taxones bacterianos distintos en una muestra determinada) y la diversidad β (número de genes de resistencia o de taxones bacterianos distintos entre muestras de la misma categoría) fueron en aumento desde el momento de la apertura de la industria, corroborando el paso de una microbiota generalista a una microbiota especializada en los distintos nichos de la industria cárnica. A nivel taxonómico, *Pseudomonas* (57% de las lecturas obtenidas) prevaleció en las superficies y mantuvo su dominancia a lo largo de todo el periodo de estudio. Tras la entrada en

Resumen

funcionamiento de la planta, con la recepción de materia prima (canales de cerdo), *Acinetobacter* y *Psychrobacter*, con 7% y 6% de las lecturas, respectivamente, comenzaron a adquirir relevancia. Los desagües o sumideros de la planta fueron los lugares de muestreo con mayor diversidad de bacterias, elementos genéticos móviles y genes de resistencia a antimicrobianos. A lo largo del tiempo se detectó un aumento en la abundancia total de genes de resistencia a antimicrobianos, que fueron asignados predominantemente a *Acinetobacter*, y se asociaron con resistencias a ciertos antimicrobianos de uso frecuente en las granjas porcinas de la región. Además, se observó un fuerte incremento en la aparición de aislados de *Enterobacteriaceae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido y *Enterococcaceae* resistentes a la vancomicina cuando comenzaron las actividades de despiece de canales. Los genes de resistencia a β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos y sulfonamidas coexistieron con frecuencia, y se detectaron varios elementos genéticos móviles (plásmidos e integrones), así como eventos de transferencia lateral de genes, principalmente en los últimos muestreos y en desagües o sumideros. Estas observaciones sugirieron que las canales de cerdo eran la fuente principal de acceso a la industria de bacterias resistentes, que luego colonizaban los ambientes de procesado, y que los desagües representaban un importante reservorio para la propagación de genes de resistencia a antimicrobianos.

En el **capítulo V** se pretendió obtener una visión más general de la distribución de bacterias resistentes a antimicrobianos y genes de resistencia a antibióticos en industrias de procesado y transformación de alimentos, analizando en esta ocasión de manera puntual, en una única visita, los ambientes de procesado de múltiples plantas de distintos sectores productivos. Para ello, se recogieron muestras de 10 superficies en contacto con alimentos (por ejemplo, mesas de trabajo, cuchillos, moldes, etc.) y 10 superficies de no contacto con alimentos (por ejemplo, desagües, suelos, paredes, etc.) en 12 plantas de procesado de leche y productos lácteos, 10 plantas de procesado de carne y productos cárnicos y 3 mataderos. En conjunto, se tomaron 500 hisopos de superficie, que fueron agrupados en 50 muestras compuestas (dos por empresa) para su análisis mediante secuenciación metagenómica total, lo que permitió identificar los principales taxones bacterianos y genes de resistencia a los antimicrobianos predominantes en las instalaciones. Las superficies de los mataderos presentaron un microbioma y resistoma más diversos, mientras que las de las plantas de procesado de leche y productos lácteos eran las que mostraban una mayor dispersión β y, por lo tanto, un microbioma y resistoma más heterogéneo entre muestras. Los géneros bacterianos predominantes dependieron del tipo de industria, siendo *Pseudomonas* y *Psychrobacter* altamente dominantes en superficies de mataderos e industrias cárnicas, mientras que diferentes bacterias ácido lácticas predominaron en ambientes de procesado de industrias

Resumen

lácteas. Los genes de resistencia a antimicrobianos más abundantes se asociaron con resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y compuestos de amonio cuaternario (QAC). Los genes de resistencia a aminoglucósidos y QAC fueron asignados mayoritariamente a los géneros *Escherichia* y *Staphylococcus*, respectivamente, mientras que las resistencias a tetraciclinas fueron portadas por una gran diversidad de géneros bacterianos. Los genes de resistencia a aminoglucósidos y tetraciclinas resultaron significativamente más abundantes en los mataderos que en las plantas de procesamiento de los sectores lácteo y cárnico, mientras que los genes de resistencia a QAC fueron particularmente predominantes en algunas superficies de contacto con alimentos de plantas de procesamiento de leche y productos lácteos, así como de carne y productos cárnicos, lo que sugiere que la aplicación en condiciones subóptimas de agentes de desinfección puede estar seleccionando en algunas instalaciones cepas persistentes tolerantes a estos biocidas. Aproximadamente el 63% de todas las lecturas asociadas a genes de resistencia a antimicrobianos se pudieron asignar a contigs clasificados como plasmídicos, lo que demuestra que la mayoría de esos genes son transmisibles y que el resistoma de los ambientes de procesamiento de alimentos se ve moldeado a través de la propagación de elementos genéticos móviles.

1. Introducción

1.1. Resistencia a antimicrobianos: concepto y mecanismos de resistencia

Aunque los términos “resistencia a antimicrobianos” o “resistencia a antibióticos” son sobradamente conocidos, resulta conveniente definirlos al inicio de esta Tesis Doctoral. De acuerdo a la definición del *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) y la *European Food Safety Authority* (EFSA) (ECDC and EFSA, 2020):

“La resistencia a antimicrobianos se define como la incapacidad o reducida habilidad de los agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de bacterias, pudiendo conducir al fallo de la terapia en caso de tratarse de bacterias patógenas. Una cepa bacteriana puede adquirir resistencia a antimicrobianos por mutaciones, incorporando genes exógenos de otras cepas bacterianas mediante transferencia horizontal, o por la activación de una cascada genética que induzca el mecanismo de resistencia”

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos (antibióticos, biocidas y metales pesados) puede, por tanto, ser mediada a través de varios mecanismos diferenciados (Figura 1). Asimismo, se puede categorizar en función de diversos factores, como su origen, durabilidad, modo de transmisión o mecanismo celular (Tabla 1) (Capita and Alonso-Calleja, 2013; Founou *et al.*, 2016; Florez-Cuadrado *et al.*, 2018; Leonard *et al.*, 2020).

Tabla 1. Categorización de la resistencia a antimicrobianos de acuerdo a distintos criterios

Origen	Durabilidad	Modo de transmisión
Intrínseca	Resistencia transitoria (ej: adaptación metabólica)	Vertical, transmisión a descendencia directa
Extrínseca o adquirida	Resistencia permanente (ej: mutación de un gen)	Horizontal, transmisión a otras cepas bacterianas

Introducción

Los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a antimicrobianos son muy diversos, pero comúnmente se agrupan en los siguientes:

- I) Reducción de la concentración de antimicrobiano en el interior de la bacteria, gracias a bombas de eflujo o a modificaciones en la membrana bacteriana que reduzcan su permeabilidad al antimicrobiano.
- II) Inactivación del antimicrobiano, mediante enzimas que degraden o secuestren al antimicrobiano.
- III) Modificación de la diana de actuación, debido a mutaciones que cambien la secuencia del gen y, en consecuencia, la estructura aminoacídica y su conformación proteica.
- IV) Hiper-producción de la diana de actuación, fruto de fenómenos de desrepresión genética a causa de cascadas de señalización (respuesta SOS).
- V) Bypass metabólico, mediante el que se desarrolla una ruta metabólica alternativa a aquella interrumpida por el antimicrobiano, pudiendo este *bypass* metabólico estar codificado en un plásmido de resistencia.

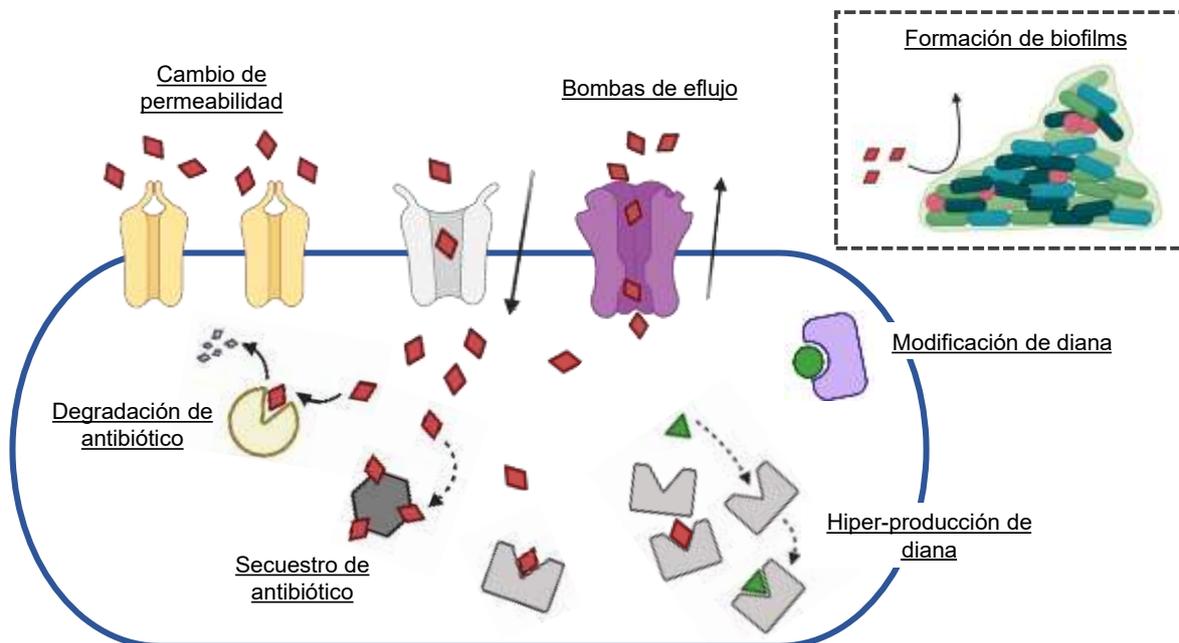


Figura 1: Principales mecanismos de resistencia a antibióticos.

1.2. El problema sanitario de la resistencia a antimicrobianos

La WHO ha categorizado recientemente, pero con anterioridad a la pandemia de COVID-19, los 10 problemas sanitarios más preocupantes para la Humanidad. Entre ellos destacan enfermedades provocadas por virus (sida, ébola, dengue y gripe), enfermedades no transmisibles (cardiopatías, cáncer, diabetes) y la resistencia a antimicrobianos (AMR, del inglés “*AntiMicrobial Resistance*”) usados para tratar y curar enfermedades infecciosas de origen bacteriano (World Health Organization, 2019).

En el año 2014, el Primer Ministro de Reino Unido (UK) encargó realizar un estudio sobre el problema mundial que suponía la AMR al economista británico Jim O’Neill. Esta iniciativa contó con las previsiones económicas de dos organizaciones independientes, RAND Europe y KPMG. Entre las múltiples conclusiones que se obtuvieron de los 9 informes publicados a lo largo de año y medio caben destacar algunas escalofriantes cifras recogidas en el primer (O’Neill, 2014) y último (O’Neill, 2016) de estos informes. Se estimó que la AMR causaba en aquel momento 700.000 muertes al año en todo el mundo, 50.000 de ellas en la Unión Europea (EU) y Estados Unidos (US), y que, si no se implementaban medidas de choque para combatir la AMR, en el año 2050 podrían morir 10 millones de personas anualmente en todo el mundo a causa de infecciones causadas por microorganismos resistentes. A nivel económico, únicamente en 2014, en US se detectaron 2 millones de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos que supusieron un coste cercano a los 20 billones de dólares, estimándose que el impacto de la AMR en los sistemas sanitarios desde la actualidad hasta 2050 causará, si no se pone remedio, pérdidas comprendidas entre 60 y 100 trillones de dólares.

1.3. Hacia una respuesta global: el plan de acción contra la AMR

La labor de concienciación sobre la AMR llevada a cabo por la WHO comenzó tiempo atrás, según los datos disponibles en su página web (WHO, 2015a), en la asamblea número 51 organizada en 1998 (WHO, 1998). La WHO, mostrando siempre un punto de vista global, ha promovido y consensado con las agencias estatales los planes y estrategias de actuación para combatir la AMR. En 2008 se formó el comité de expertos *WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance* (AGISAR) para asesorar a la WHO en la integración de sistemas de vigilancia de AMR, la definición de los antimicrobianos de importancia crítica (CIA, del inglés *Critically Important Antimicrobials*) para salud humana y en el análisis de la AMR en la cadena alimentaria (WHO, 2009). Además, en 2013 se formó un segundo comité de expertos denominado *Strategic and Technical Advisory Group on*

Introducción

antimicrobial resistance (STAG) (WHO, 2013), cuyas funciones incluyen la coordinación de la respuesta de la WHO frente a la AMR, la identificación de los retos y problemas que se interponen en los objetivos del plan, y el fomento de la participación de los países miembro en estas iniciativas.

Durante 2014 la WHO lanzó el primer estudio mundial sobre la situación de la AMR y los sistemas de vigilancia. Este informe destacó carencias en la coordinación, estandarización de protocolos, y el intercambio abierto de datos de cara a paliar la situación (WHO, 2014). Posteriormente, en 2015 se publicó el primer plan estratégico global (Figura 2) para paliar la AMR (WHO, 2015b). Este plan contó con la participación de otras grandes organizaciones mundiales, como la FAO y la *World Organization for Animal Health* (OIE).



Figura 2: Cinco objetivos clave del plan global contra la AMR.

1.3.1. Vigilancia en la Unión Europea y en España

Históricamente cada país ha seguido sus propios criterios a la hora de determinar si un microorganismo patógeno era resistente o susceptible a los diversos antimicrobianos que iban surgiendo en base a puntos de corte clínicos (concentraciones de antimicrobianos que diferenciaban si un tratamiento sería eficaz o no para eliminar una posible infección). Algunos de ellos contaban con comités propios, mientras que otros seguían los protocolos y definiciones marcadas por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de US (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021).

Los microorganismos (y las resistencias a antimicrobianos que pueden adquirir) declarados como más preocupantes por la WHO se muestran en la Figura 3 (WHO, 2017b). Existe un predominio de microorganismos Gram negativos frente a Gram positivos, y, en cuanto a las resistencias críticas, la mayor parte atañen a antibióticos β -lactámicos, los primeros antibióticos descubiertos (Kong *et al.*, 2010).

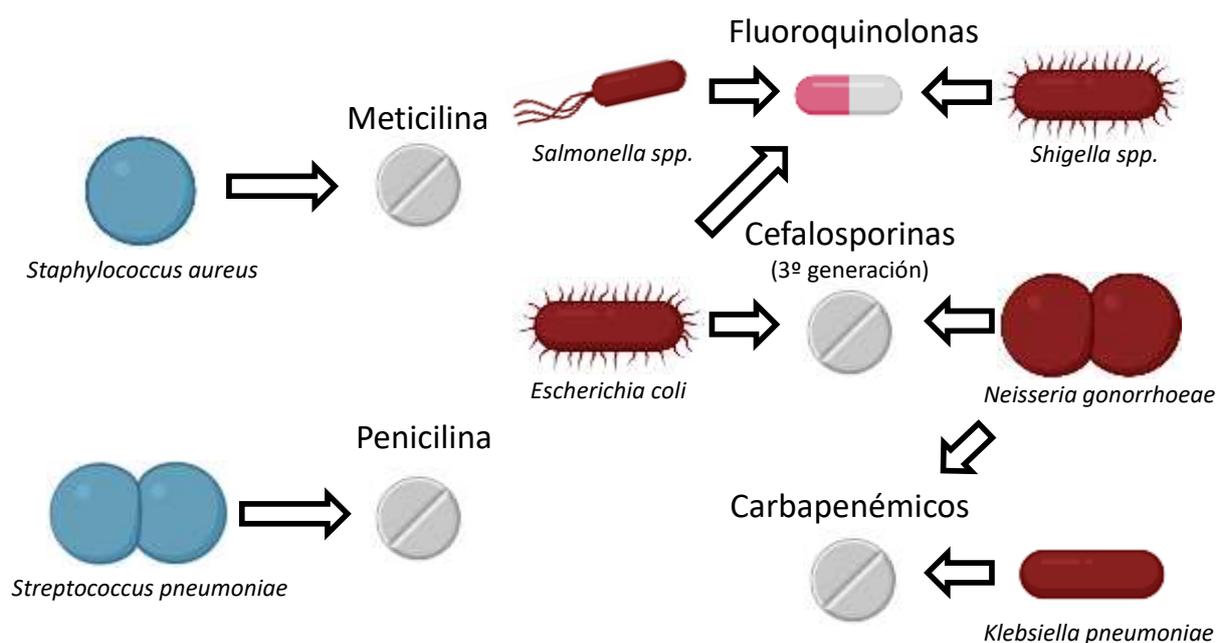


Figura 3: Microorganismos patógenos y resistencias a antimicrobianos de importancia crítica para la WHO. El color de las bacterias indica la clasificación por tinción de Gram, azul (Gram positivo) y rojo (Gram negativo). Excepto las fluoroquinolonas, el resto de antibióticos pertenecen a la familia de los β -lactámicos.

A finales del siglo XX, La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) tomó medidas decisivas para la armonización de criterios, procedimientos y puntos de corte clínicos en los distintos estados miembros de la UE. En 1997

Introducción

se constituyó el Comité Europeo de Análisis de la Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST). A su vez, en 2001, EUCAST constituyó un comité directivo, integrado por miembros de comités nacionales, dedicado al establecimiento de puntos de corte clínicos a fin de centralizar y coordinar los procesos referentes al análisis de la susceptibilidad a antimicrobianos en la EU (Kahlmeter, 2015). Los expertos que formaron ese primer comité directivo de EUCAST provenían de Alemania, Francia, Noruega, Países Bajos, Suiza y UK.

Aunque hayan pasado más de 20 años desde entonces, todavía existen laboratorios dentro de la EU que trabajan bajo las directrices y criterios del CLSI americano. Sin embargo, se citan a continuación varias de las ventajas que ofrece el trabajar en base a los criterios de EUCAST (Kassim *et al.*, 2016):

- Las guías de EUCAST son gratuitas, lo que elimina barreras económicas en su implantación.
- Los criterios en los que se basan los cambios de los puntos de corte clínicos son públicos.
- El CLSI recibe pautas de la Administración de Alimentos y Medicamentos de US (FDA) y no es totalmente independiente de la industria farmacéutica. EUCAST, si bien cuenta con asesores externos de la industria, es totalmente independiente a nivel económico de la industria farmacéutica (Kassim *et al.*, 2016; Larrosa *et al.*, 2020).
- Además de los puntos de corte clínicos, EUCAST aporta puntos de corte epidemiológicos que permiten a los epidemiólogos y otros profesionales determinar si un microorganismo tiene una resistencia adquirida (pudiendo deberse a factores que se detallarán más adelante) que no es común en la población general de esa especie microbiana.

A pesar de las ventajas anteriormente citadas, todavía hay laboratorios o incluso países dentro de la EU que no se han adaptado por completo a los criterios de EUCAST (Brown *et al.*, 2016; Larrosa *et al.*, 2020), y el cambio de CLSI a EUCAST en países externos a la EU es todavía incipiente (Cusack *et al.*, 2019). Incluso en relación a los informes anuales de la Red Europea para la Vigilancia de la Resistencia a Antimicrobianos (EARS-Net), dirigida por el ECDC, el informe de 2019 ha sido el primero en recabar datos de laboratorios que tuvieran totalmente implantadas las recomendaciones de EUCAST.

El ECDC comenzó su andadura el 21 de abril de 2004, cuando el Parlamento Europeo, junto a la Comisión de la UE, aprobaron el Reglamento 851/2004 (European Parliament and Council of the European Union, 2004). En esta resolución se establecieron las bases y funciones que debería desempeñar el ECDC. Entre las funciones principales del centro se encuentran la asesoría científica, la vigilancia epidemiológica, el estudio microbiológico o la formación de profesionales sanitarios (ECDC, 2021a). Se trata de un centro que dirige y monitoriza programas centrados en el control de infecciones hospitalarias, resistencias a

Introducción

antimicrobianos, enfermedades transmitidas por aguas y/o alimentos, y virus (por ejemplo, hepatitis o influenza). En su página web hay disponibles gran cantidad de datos, infografías y herramientas sobre AMR, como el atlas de vigilancia de enfermedades infecciosas (ECDC, 2021d), que muestra la situación epidemiológica de distintos patógenos de importancia clínica en los países de la UE.

El ECDC recopila gran cantidad de datos que aportan los institutos y laboratorios de referencia de los estados miembros de la EU con el fin de coordinar actuaciones y tener una visión de conjunto del estado de la EU en cuanto a la presencia de riesgos biológicos. Para ello, ha diseñado un formato de almacenamiento de datos flexible (TESSy) (ECDC, 2021e) en el que reúne información sobre distintas enfermedades (Commission of the European Communities, 2000). En lo que respecta a la problemática de la AMR, cabe también destacar la existencia de dos organizaciones coordinadas por el ECDC, la EARS-Net (ECDC, 2021b) y la Red Europea para la vigilancia del consumo de Antimicrobianos (ESAC-Net) (ECDC, 2021c). En España hay dos instituciones que notifican datos a EARS-Net, el Instituto de Salud Carlos III y el Centro Nacional de Microbiología.

La EARS-Net publica anualmente informes sobre bacterias patógenas aisladas de sangre o líquido cefalorraquídeo humanos, haciendo referencia el último de ellos a datos relativos al año 2019 (ECDC, 2020). Estos informes muestran tendencias sobre la situación europea de la AMR y sus repercusiones para la salud humana, ayudan al diseño de políticas y permiten comparar la evolución de este problema en/entre los distintos países a lo largo del tiempo (Lake *et al.*, 2019). Se muestra en la Tabla 2 la evolución de la prevalencia de bacterias patógenas aisladas en España durante los últimos 5 años, y una comparativa respecto al global de la EU (para la última anualidad para la que se disponen datos) para los 8 patógenos que vigila EARS-Net (Tabla 2). La Figura 4 recoge la evolución temporal de la AMR para aquellas combinaciones de patógeno-antibiótico consideradas críticas por la WHO.

Introducción

Tabla 2: Prevalencia de microorganismos patógenos en sangre y líquido cefalorraquídeo

Año	España					EU
	2015	2016	2017	2018	2019*	2019*
<i>Acinetobacter</i> spp.	0,7%	0,8%	0,7%	0,5%	0,5%	1,7%
<i>E. faecalis</i>	7,5%	7,2%	7,6%	7,0%	7,2%	6,8%
<i>E. faecium</i>	0,4%	4,6%	4,7%	4,6%	4,7%	4,5%
<i>E. coli</i>	49,1%	49,7%	47,3%	47,7%	46,8%	44,2%
<i>K. pneumoniae</i>	11,4%	12,3%	11,9%	12,0%	13,5%	11,3%
<i>P. aeruginosa</i>	6,7%	6,2%	6,6%	6,7%	6,4%	5,6%
<i>S. aureus</i>	15,1%	14,4%	15,0%	15,2%	15,1%	20,6%
<i>S. pneumoniae</i>	5,1%	4,9%	5,7%	6,2%	5,8%	5,3%
Total de aislados	13.320	13.696	12.752	16.627	15.671	275.883

Los datos referentes al número de aislados en España han sido extraídos de las tablas suplementarias del informe anual de EARS-Net correspondiente a 2019 (ECDC, 2020).

En la última fila aparece el total de aislados bacterianos resistentes a antimicrobianos. Los porcentajes de cada fila indican la frecuencia de aparición de cada especie bacteriana en relación al número de aislados bacterianos resistentes detectados cada año (columna). Únicamente se han representado los datos de los microorganismos para los que fue posible determinar el perfil de resistencias a antibióticos.

* Los datos correspondientes a 2019 fueron recabados únicamente de laboratorios que cumplieran con los protocolos de EUCAST.

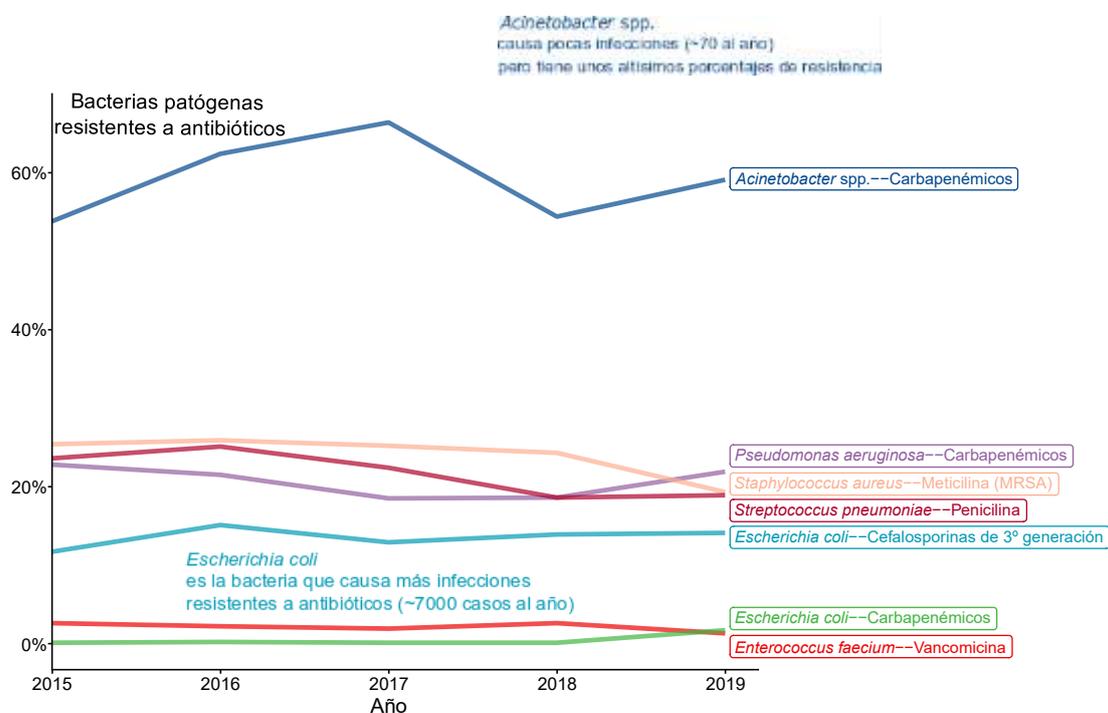


Figura 4: Porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos aisladas en España en los últimos 5 años.

Introducción

Aunque estos datos corresponden a microorganismos aislados de muestras sanguíneas o líquido cefalorraquídeo, teniendo consecuentemente un sesgo, permiten identificar tendencias temporales. Por ejemplo, durante el año 2019 se obtuvieron 15.671 aislados de estos 8 patógenos de importancia clínica, lo que representa un 5,7% de los aislados de toda la UE. Aunque en los últimos años se ha producido un descenso desde un 49,1% a un 46,8% en el porcentaje de infecciones causadas por *E. coli*, todavía España se sitúa por encima de la media europea, mientras que en el caso de *S. aureus* se mantiene cinco puntos porcentuales por debajo de la incidencia media en la EU. Respecto a la AMR se aprecia también una reducción en el porcentaje de *S. aureus* resistente a meticilina, así como de *S. pneumoniae* resistente a penicilina. En cuanto a *Acinetobacter* spp., este género bacteriano presenta con diferencia la mayor proporción de aislados resistentes, aunque, afortunadamente se identifica en un bajo número de infecciones (Tabla 2, 0,5-0,8% de los casos), explicando así las fluctuaciones temporales observadas.

Por su parte, la ESAC-Net aporta información sobre el consumo de antimicrobianos en hospitales y en el entorno comunitario. En su último informe (ECDC, 2020) se describe una tendencia significativa de reducción de la dosis diaria definida (DDD) por 1000 habitantes para el conjunto de la UE, Islandia y Noruega desde el año 2010 a la actualidad. En el caso de España también se ha reducido de forma significativa la DDD de antibióticos de uso sistémico en ambos sectores (hospitalario y comunitario), si bien todavía nuestra DDD (24,7) está lejos de la media europea (19,4).

El progreso y desarrollo de las iniciativas europeas contra la AMR fue también evaluado por la Comisión Europea en 2016 (Smith *et al.*, 2016), tras la redacción en 2015 del plan de acción europeo contra la AMR (European Commission, 2015).

1.3.2. El enfoque One Health, la resistencia a antimicrobianos más allá del hospital

En el informe mundial sobre la situación global de la AMR realizado por la WHO en 2014 (WHO, 2014) quedó reflejada la importancia que tiene en la actual crisis sanitaria el uso de antibióticos en animales de abasto. El empleo de antibióticos en animales para el tratamiento de enfermedades, la prevención de enfermedades (metafilaxis y profilaxis), o como promotores de crecimiento ha contribuido y sigue contribuyendo de forma significativa al problema de la AMR (Hudson *et al.*, 2017).

A finales del año 2016, tras la publicación del plan global contra la AMR (WHO, 2015b), la Organización de las Naciones Unidas (ONU) decidió, en asamblea general, formar el Grupo de Coordinación Interinstitucional sobre Resistencia a Antimicrobianos (ICGA) para

Introducción

desarrollar y evaluar políticas que paliasen la AMR desde un enfoque *One Health* (United Nations, 2016). Este grupo de coordinación se denominó *Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance* (WHO, 2021a), y en él participan la FAO, la WHO y la OIE junto a la ONU. El ICGA, además de mejorar la coordinación de estas políticas en los distintos países, ha elaborado informes y recomendaciones en consonancia con el plan global de lucha frente a la resistencia a los antimicrobianos, velando por la sostenibilidad de las políticas necesarias para reducir la AMR (IACG, 2019).

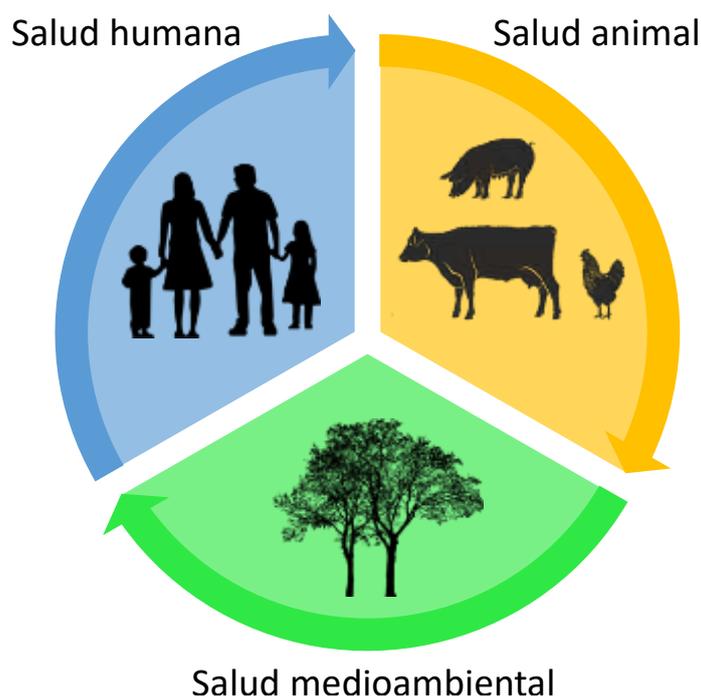


Figura 5: Concepto de One Health. El concepto One Health parte de la base de que la salud humana, animal y medioambiental están interconectadas y busca soluciones compensadas que resuelvan los problemas de un área sin perjudicar a las otras (Mackenzie and Jeggo, 2019).

De forma similar a la constitución del ICGA a nivel mundial, en la EU también se ha fomentado (sin llegar a formar un grupo de coordinación) combatir la AMR desde un enfoque *One Health* mediante la cooperación de agencias con experiencia en distintas áreas (salud humana, salud animal y seguridad alimentaria). La EFSA, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y el ECDC han elaborado de forma conjunta dos informes multisectoriales sobre la AMR bajo las siglas JIACRA (*Joint Inter-Agency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis*) que realizan un análisis de situación para los años 2011-2012 (ECDC *et al.*, 2015) y 2013-2015 (ECDC *et al.*, 2017). Otros ejemplos del compromiso de la EU en la lucha contra la AMR son los informes publicados anualmente por

Introducción

la EFSA y el ECDC, en los que se estudian las principales enfermedades zoonóticas (ECDC and EFSA, 2019), y el nivel de AMR detectado en bacterias zoonóticas o indicadoras (ECDC and EFSA, 2020).

En conjunción con los informes sobre consumo de antibióticos en hospitales y sector comunitario realizados por ESAC-Net previamente mencionados, la EMA elabora informes anuales referentes al consumo de antimicrobianos de uso veterinario. La EMA recopila y publica anualmente informes sobre la venta y consumo de agentes antimicrobianos de uso veterinario a través del programa europeo de vigilancia sobre el consumo de antimicrobianos (ESVAC). El último de ellos corresponde a datos del 2018 (EMA, 2020). En ellos se cuantifica la venta de antimicrobianos como polimixinas, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, fluoroquinolonas, etc. Se ha detectado a nivel global durante los años 2011 a 2018 una reducción en la venta de polimixinas (70%), quinolonas (4% para fluoroquinolonas, 74% para otras quinolonas), y cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (24%), lo que muestra la eficacia de los planes globales y europeos previamente descritos. Si bien los propios informes desaconsejan comparar directamente los países dada la diversidad entre ellos en cuanto a su economía y sus sistemas de producción ganadera, se comentan, a continuación, algunos datos de relevancia:

- España fue el país que más toneladas de antimicrobianos de uso veterinario vendió durante 2018 (1.724 toneladas), seguida en segundo lugar por Italia (932 toneladas).
- La estimación de toneladas de biomasa animal producida en España fue de 7.865, mientras que Alemania produjo 8.518 toneladas, registrando ventas de 753 toneladas de antimicrobianos.
- En la unidad estandarizada de consumo de antimicrobianos por animal (mg de antimicrobiano / tonelada de biomasa animal), que tiene en cuenta el tamaño de la población animal, España (219 mg antimicrobiano / kg biomasa animal) fue únicamente superada por Italia (244 mg antimicrobiano / kg biomasa animal) y Chipre (466 mg antimicrobiano / kg biomasa animal).

En consecuencia, aunque España sea uno de los principales países productores de biomasa animal de la EU el sistema productivo es en gran medida dependiente de un elevado empleo de antibióticos de uso veterinario. Nuevas medidas enmarcadas dentro del enfoque *One Health* serán necesarias para mantener la producción a la vez que se reduce el consumo de antibióticos, evitando así la generación de resistencias y mejorando la opinión del consumidor sobre los productos de origen animal producidos en España.

1.3.3. La cadena alimentaria, la ruta de la granja a la mesa

La cadena alimentaria comprende todas las etapas desde la producción primaria y transformación o procesado de un alimento hasta su ingesta por parte del consumidor. La WHO estima que 400.000 personas mueren al año a causa de enfermedades transmitidas por alimentos (WHO, 2021b). Sólo en la UE, durante 2019 se produjeron 5.175 brotes de toxiinfección alimentarias que causaron 49.463 casos de infección, la hospitalización de 3.859 pacientes, y 60 defunciones (ECDC and EFSA, 2020). La complejidad y alto grado de interconexión de los distintos eslabones de la cadena alimentaria, su papel en la dispersión de agentes zoonóticos, así como las graves consecuencias que podría tener el aumento de la AMR en los microorganismos que forman parte de ella, han sido y son actualmente estudiados por la comunidad científica desde múltiples puntos de vista. Por ejemplo, revisando la problemática de la dispersión de la AMR en distintos ámbitos: agricultura, clínica, veterinaria o el ambiente (Kumar *et al.*, 2020), comentando distintas soluciones. En la revisión bibliográfica realizada por Anna George se pone el foco en las implicaciones políticas que influyen en la legislación sobre AMR (George, 2019). La conexión entre la incidencia de la AMR en animales de producción y la incidencia de la AMR en humanos es el tema central de la revisión publicada por Bennani *et al.* (Bennani *et al.*, 2020), en la que se concluye que existe la necesidad de un enfoque holístico y de implementar técnicas de secuenciación masiva para ampliar el conocimiento sobre la microbiota (comunidad de microorganismos presentes en un alimento o ambiente) y resistoma (conjunto de determinantes genéticos responsables de la AMR) de la cadena alimentaria.

Además de los esfuerzos de distintas organizaciones a la hora de buscar soluciones a la AMR en la cadena alimentaria, diversos investigadores, incluyendo los citados en el párrafo anterior, coinciden en abordar esta temática de investigación dedicando sus esfuerzos a estudiar el problema de la dispersión de la AMR en la cadena alimentaria. El interés de la comunidad científica puede contribuir a avanzar en la gestión y análisis de riesgos en las industrias alimentarias, como Bengtsson señala en su artículo (Bengtsson-Palme, 2017), recomendando monitorizar la presencia de AMR mediante técnicas de nueva generación, como el análisis metagenómico. En opinión del autor, no se ha de desestimar el riesgo de que otras bacterias no patógenas posean también determinantes de resistencia a antimicrobianos. Impedir la transmisión de estos determinantes genéticos desde miembros de la microbiota industrial a bacterias con potencial patogénico es también una estrategia que ayudaría a minimizar el riesgo de dispersión de la AMR en la cadena alimentaria.

1.4. Persistencia bacteriana en ambientes industriales, un escoyo para el control de la AMR en la cadena alimentaria

Para asegurar la inocuidad alimentaria y prolongar la vida útil de los alimentos, la industria alimentaria realiza continuos ciclos de limpieza y desinfección de sus instalaciones para evitar episodios de contaminación microbiana. Adicionalmente, también se documenta la trazabilidad de las materias primas y se realizan controles de calidad microbiológica para la detección precoz de problemas asociados a la contaminación de materias primas, ambientes de procesado, y producto final por microorganismos alterantes y/o patógenos.

Sin embargo, incluso en ambientes, salas o recintos de tránsito reducido y elevado grado de limpieza y desinfección, determinadas bacterias sobreviven y siguen presentes tras los procesos de limpieza y desinfección, como se ha podido observar incluso en quirófanos hospitalarios (Kanamori *et al.*, 2020). Estos autores observaron que los quirófanos en los que se había intervenido a pacientes con infecciones causadas por patógenos multirresistentes tenían mayor incidencia de complicaciones causadas por infecciones quirúrgicas, a pesar de que aplicaban protocolos rutinarios de limpieza y desinfección, debido a la presencia de patógenos persistentes en las superficies del quirófano. Si esta situación ocurre en un quirófano, cabe esperar que también pueda suceder en ambientes de industrias alimentarias, donde también se ha descrito que es frecuente la presencia de microorganismos persistentes.

Como se detalla en la Figura 6, la persistencia bacteriana en plantas de procesado de alimentos ocurre por la reintroducción continua de bacterias a través de las materias primas, operarios, instrumental, etc., o bien porque dichas bacterias son capaces de tolerar los procesos destinados a erradicarlas. La persistencia bacteriana y la AMR están íntimamente relacionadas. De hecho, en la opinión científica realizada por el panel de peligros biológicos (BIOHAZ) de EFSA sobre la influencia del ambiente en la aparición y diseminación de AMR se recogen algunos puntos de gran interés en el epígrafe 1.4 (BIOHAZ EFSA panel, 2021) y se pone de manifiesto la importancia de la persistencia bacteriana en relación al problema que representa la AMR.

Aunque la persistencia de bacterias no patógenas portadoras de determinantes de AMR no representa un peligro directo, Windels *et al.* (2019) advierten que éstas pueden presentar una mayor capacidad de mutación. Tasas de mutación elevadas anticiparán la aparición de resistencias a antibióticos (Van Den Bergh *et al.*, 2016), habiéndose observado mutaciones comunes asociadas a fenotipos persistentes en bacterias con determinantes de AMR (Defraigne *et al.*, 2018). La persistencia de estas bacterias se fundamenta parcialmente en su capacidad de respuesta al estrés asociado a los procesos de limpieza y desinfección, llegando

Introducción

a elevar (dependiendo del tipo de estrés) la transmisión horizontal de genes de respuesta a estrés (Cohen *et al.*, 2013). Estos genes de tolerancia a estrés pueden co-existir con determinantes de AMR en el mismo elemento genético, favoreciendo su dispersión.

Más allá del riesgo directo de que bacterias patógenas sean persistentes en la industria alimentaria y causen episodios de contaminación de alimentos y brotes de toxiinfección alimentaria recurrentes, el riesgo de que adquieran AMR es también más elevado. Se han descrito correlaciones positivas entre persistencia y desarrollo de AMR (Windels *et al.*, 2019). Este hecho fue corroborado por otros autores (Defraigne *et al.*, 2018) que observaron una mayor representación de bacterias persistentes entre especies patógenas procedentes de muestras clínicas en comparación con las mismas especies patógenas provenientes de muestras ambientales (menos sujetas a estreses destinadas a erradicarlas). Esta fracción de bacterias persistentes sería capaz de tolerar tratamientos de desinfección y competir con ventaja frente a una microbiota industrial mermada tras la limpieza, e incluso gracias a su mayor capacidad mutagénica podría desarrollar un fenotipo más virulento (Whelan *et al.*, 2019).

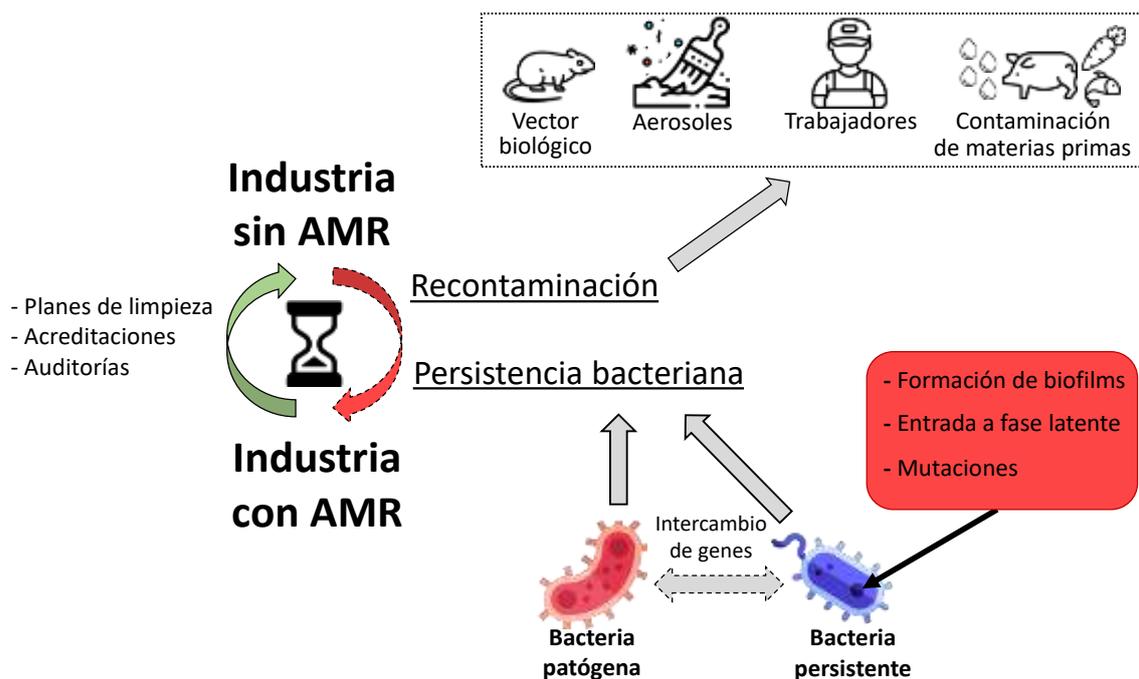


Figura 6: Persistencia microbiana y AMR.

Las industrias controlan la presencia de bacterias alterantes y patógenas mediante diversas prácticas relacionadas con la desinfección de sus instalaciones. Ya sea por la recontaminación o por la capacidad de persistir a los procesos de limpieza, determinadas bacterias pueden convertirse en microorganismos persistentes y aumentar el riesgo de aparición de AMR en las instalaciones.

Introducción

Tanto la reintroducción continua de bacterias, como la persistencia bacteriana promovida por la supervivencia y colonización ambiental de nichos y reservorios industriales, tienen el mismo resultado, el aislamiento repetido de cepas indistinguibles a lo largo del tiempo cuya presencia en las superficies y equipos de la industria alimentaria supone un riesgo para productor y consumidor. La aplicación del análisis de genoma completo a aislados obtenidos en actividades de monitorización ambiental puede aportar información de gran utilidad para dilucidar si la persistencia se debe únicamente a la reintroducción continua de bacterias en la industria, a la persistencia ambiental mediada por factores intrínsecos bacterianos o a una combinación de ambos fenómenos. No obstante, cuando en esta Tesis Doctoral se hable de persistencia microbiana se hará pensando en la persistencia ambiental mediada por mecanismos moleculares de supervivencia y respuesta al estrés frente a los antimicrobianos.

1.4.1. Riesgo del procesado de alimentos para la dispersión de AMR en la cadena alimentaria.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se publicó una revisión bibliográfica en la revista *Current Opinion in Food Science* titulada “Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain”. En esta revisión bibliográfica, que se reproduce en las próximas páginas, se describe con mayor detalle el riesgo que representa la AMR en la cadena alimentaria y se discute la evidencia de que ciertos compuestos desinfectantes y tecnologías de higienización o descontaminación pueden seleccionar variantes resistentes a antimicrobianos si son aplicadas a intensidades sub-letales. La selección de variantes resistentes a antimicrobianos producida por los protocolos de desinfección de la industria alimentaria, selección previamente descrita (Verraes *et al.*, 2013a), es de gran importancia por los fenómenos de resistencia cruzada y de co-resistencia. Estos fenómenos, tanto la resistencia cruzada como la co-selección, propician la aparición de cepas persistentes y/o variantes resistentes a antibióticos.

Introducción

1.4.2. *Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain.*

Autores

Elena-Alexandra Oniciuc^{1,5}, Eleni Likotrafiti^{2,5}, Adrián Álvarez-Molina³, Miguel Prieto^{3,4}, Mercedes López^{3,4}, Avelino Álvarez-Ordóñez^{3,4}.

Revista

*Current Opinion in Food Science, Elsevier. Volumen 30,
Páginas 21-26, diciembre 2019.*

DOI

<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.002>

1. Faculty of Food Science and Engineering, Dunarea de Jos University of Galati, Galati, Romania
2. Department of Food Technology, Laboratory of Food Microbiology, Alexander Technological Educational Institute of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece
3. Department of Food Hygiene and Technology, Universidad de León, León, Spain
4. Institute of Food Science and Technology, Universidad de León, León, Spain
5. These two authors equally contributed to the work.

Abstract

Farms and food industries rely to a large extent on the use of biocides as disinfectants and other antimicrobial agents and preservatives with antimicrobial properties in order to provide food of high microbiological quality and safe for consumers. However, in the last decades it has become apparent that long-term sub-lethal exposure to these antimicrobial agents can exert a selective pressure leading to the emergence and spread of microbial strains with a reduced susceptibility to the used antimicrobials, which can persistently colonize food-processing environments and recurrently contaminate food. In addition, it may induce resistance to unrelated and clinically relevant antibiotics, in a phenomenon known as cross-resistance. This review aims to provide insights on how antimicrobial resistance emergence and spread can be affected by certain food processing activities and to discuss recent research focused on different pathways through which biocides and other antimicrobials could co-select for bacteria resistant to clinically relevant antibiotics.

Artículo disponible en



<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.002>

Introducción

Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain

1.5. Técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos: un cambio de paradigma en seguridad alimentaria

Hasta la fecha los sistemas de monitorización de microorganismos patógenos para asegurar la inocuidad alimentaria, así como los métodos para obtener el perfil de resistencias fenotípicas a antibióticos (ya sea de aislados clínicos, o de patógenos transmisibles por el consumo de alimentos), se han fundamentado en métodos de microbiología clásica dependientes de cultivo.

Pero en la última década se han producido grandes avances en el terreno de las tecnologías de secuenciación masiva de ADN (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017). Inicialmente, la secuenciación del ADN se realizaba mediante la técnica Sanger. El gran avance y abaratamiento de tiempo y costes en la secuenciación del ADN comenzó en la primera década del siglo XXI con el desarrollo y empleo cada vez más común de técnicas de secuenciación de siguiente generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), también denominadas de segunda generación. Se muestran a continuación dos gráficos sobre el abaratamiento de costes de secuenciación (Figuras 7 y 8), obtenidos de la web del Instituto Nacional de Investigación sobre el Genoma Humano de US (NHGRI, 2020).

En el año 2016 EUCAST valoró la evidencia científica existente de cara a introducir las técnicas de NGS en la monitorización de la resistencia a los antimicrobianos (Ellington *et al.*, 2017). Si bien se consideró a las técnicas de secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS) como una tecnología prometedora, que podría en un futuro llegar a coexistir o incluso sustituir al análisis de resistencias por métodos fenotípicos, se concluyó que no había hasta la fecha evidencias sólidas que respaldaran la incorporación de técnicas de secuenciación masiva para la monitorización rutinaria de la susceptibilidad a antimicrobianos. Entre las razones de esta opinión negativa se encontraban: la falta de estudios en los que se analizaran gran cantidad de aislados de diversas especies patógenas en cuanto a su resistencia a diferentes tipos de antibióticos, los costes estructurales inasumibles para la mayoría de países o centros de referencia, la necesidad de estandarizar controles de calidad (métricas) o la carencia de bases de datos que permitiesen el intercambio de información entre distintos ámbitos geográficos.

Introducción

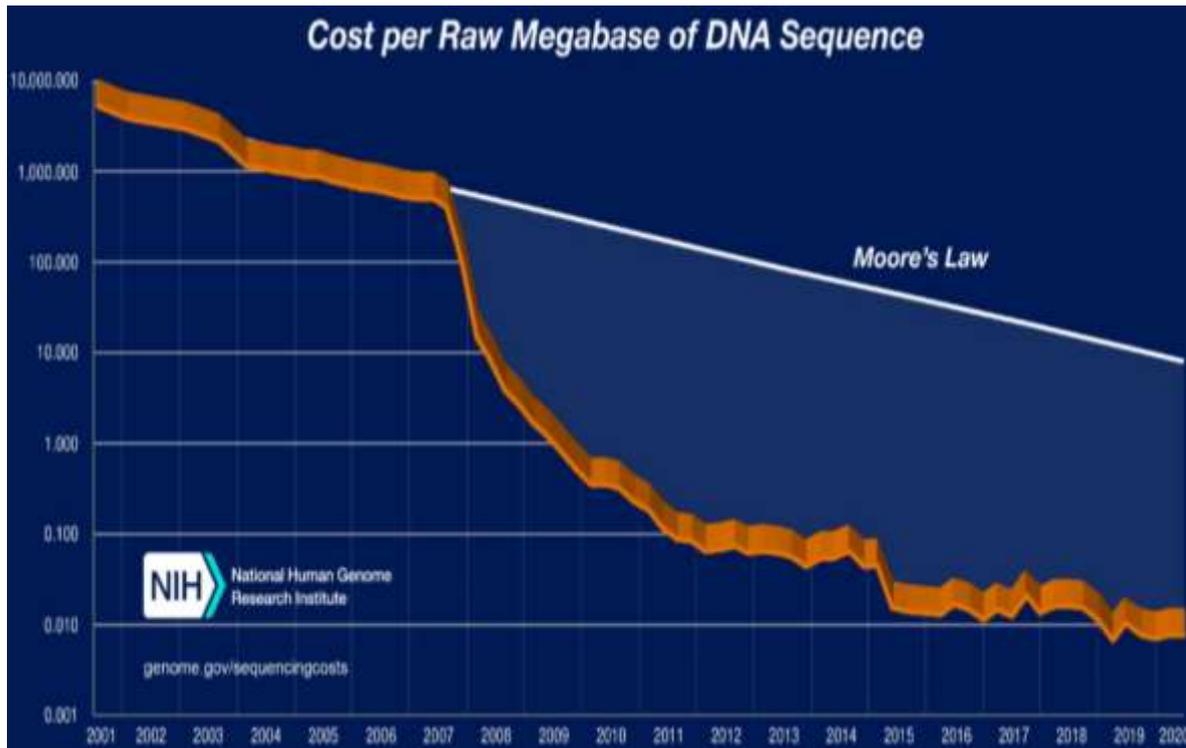


Figura 7: Evolución del coste (\$/Mbp) de secuenciación de un mega par de bases de ADN en los últimos 20 años.

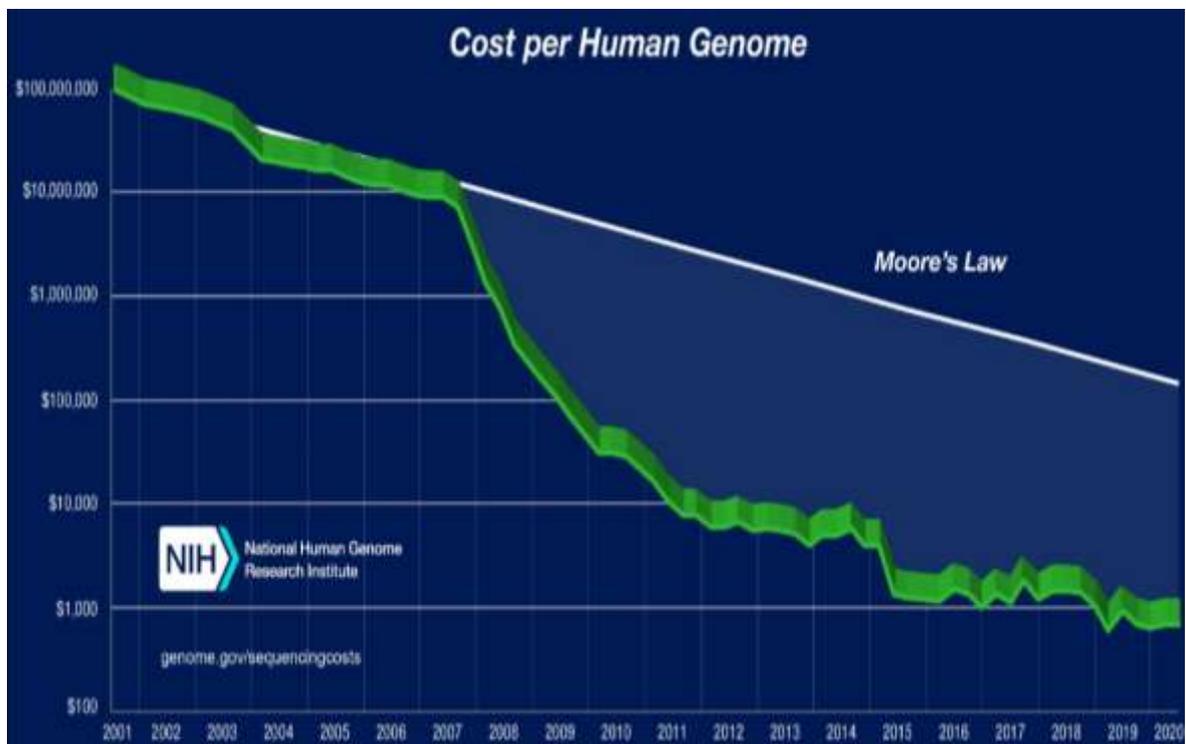


Figura 8: Evolución del coste (\$) de secuenciación de un genoma humano en los últimos 20 años.

Introducción

No obstante, en una opinión científica más reciente del panel “*BIOHAZ*” de riesgos biológicos de la EFSA (BIOHAZ EFSA panel, 2019) se evaluó la capacidad de las tecnologías de WGS para el serotipado de *Salmonella* y *E. coli* productora de toxina tipo shiga (STEC) y para la monitorización de la AMR, encontrándose una buena correlación entre los datos fenotípicos de AMR y las predicciones obtenidas a partir de análisis de WGS. De hecho, en dicha opinión científica se emite una recomendación a los laboratorios europeos para que fomenten la construcción de infraestructuras necesarias para la ejecución de análisis de WGS y metagenómica, y se anima a los grupos de investigación a que continúen desarrollando estudios de monitorización de AMR empleando WGS y metagenómica sin perder de vista la importancia de elaborar protocolos estandarizados. Por otra parte, la EFSA y el ECDC publicaron también un informe técnico en el que evaluaron 11 plataformas distintas usadas para el almacenamiento y análisis de los datos de WGS para distintos patógenos bacterianos (EFSA and ECDC, 2019)

1.5.1. Presente y futuro de la secuencia masiva del genoma (WGS) y secuenciación masiva de metagenoma (WMS) para el control de microorganismos resistentes y de genes de resistencia a antimicrobianos en la cadena alimentaria

Se adjunta a continuación una segunda revisión bibliográfica desarrollada durante la realización de esta Tesis Doctoral. La revisión, titulada “The Present and Future of Whole Genome Sequencing (WGS) and Whole Metagenome Sequencing (WMS) for Surveillance of Antimicrobial Resistant Microorganisms and Antimicrobial Resistance Genes across the Food Chain”, fue publicada en la revista *Genes* (Oniciuc *et al.*, 2018). En esta revisión se amplían los detalles sobre la importancia de las nuevas técnicas de secuenciación masiva de ADN en la vigilancia de la AMR en la cadena alimentaria, y se recopilan nuevos estudios demostrando una alta correlación entre los datos de susceptibilidad fenotípica a antibióticos y las predicciones realizadas a partir de la identificación de genes de resistencia mediante WGS.

Introducción

1.5.2. The Present and Future of Whole Genome Sequencing (WGS) and Whole Metagenome Sequencing (WMS) for Surveillance of Antimicrobial Resistant Microorganism and Antimicrobial Resistance Genes across the Food Chain

Autores

Elena A. Oniciuc^{1,4}, Eleni Likotrafiti^{2,4}, Adrián Álvarez-Molina³, Miguel Prieto³, Jesús A. Santos³, Avelino Álvarez-Ordóñez³

Revista

*Genes, MDPI. Volumen 9 ,
número 5, artículo 268.
mayo de 2018*

DOI

<https://doi.org/10.3390/genes9050268>

1. Faculty of Food Science and Engineering, Dunarea de Jos University of Galati, Galati 800008, Romania
2. Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Technology, Alexander Technological Educational Institute of Thessaloniki, Thessaloniki T.K. 57400, Greece
3. Department of Food Hygiene and Technology and Institute of Food Science and Technology, Universidad de León, 24071 León, Spain
4. These authors contributed equally to this work.

Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) surveillance is a critical step within risk assessment schemes, as it is the basis for informing global strategies, monitoring the effectiveness of public health interventions, and detecting new trends and emerging threats linked to food. Surveillance of AMR is currently based on the isolation of indicator microorganisms and the phenotypic characterization of clinical, environmental and food strains isolated. However, this approach provides very limited information on the mechanisms driving AMR or on the presence or spread of AMR genes throughout the food chain. Whole-genome sequencing (WGS) of bacterial pathogens has shown potential for epidemiological surveillance, outbreak detection, and infection control. In addition, whole metagenome sequencing (WMS) allows for the culture-independent analysis of complex microbial communities, providing useful information on AMR genes occurrence. Both technologies can assist the tracking of AMR genes and mobile genetic elements, providing the necessary information for the implementation of quantitative risk assessments and allowing for the identification of hotspots and routes of transmission of AMR across the food chain. This review article summarizes the information currently available on the use of WGS and WMS for surveillance of AMR in foodborne pathogenic bacteria and food-related samples and discusses future needs that will have to be considered for the routine implementation of these next-generation sequencing methodologies with this aim. In particular, methodological constraints that impede the use at a global scale of these high-throughput sequencing (HTS) technologies are identified, and the standardization of methods and protocols is suggested as a measure to upgrade HTS-based AMR surveillance schemes.

Artículo disponible en



<https://doi.org/10.3390/genes9050268>

Introducción

The Present and Future of Whole Genome Sequencing...

2. Justificación y

objetivos

Justificación y objetivos

En la última década se han diseñado a nivel global, continental y nacional diversas iniciativas para combatir el preocupante aumento de la AMR. El foco de atención se ha colocado principalmente en el ámbito clínico, donde numerosas investigaciones han estudiado aislados bacterianos obtenidos de pacientes junto con ambientes de hospitales y centros de salud. No obstante, numerosas agencias, autoridades, así como la comunidad científica, han puesto sobre la mesa de debate la importancia de ampliar las investigaciones prestando también atención a la cadena alimentaria. Entre las evidencias que avalan la importancia de conocer mejor la situación en el ámbito alimentario se encuentran diversos hechos como la gran cantidad de fármacos antimicrobianos consumidos por el sector ganadero, la posible co-selección que pueden ejercer determinados desinfectantes que actúan sobre las mismas dianas celulares que algunos antibióticos o el gran número de personas a las que pueden afectar los brotes de toxoinfección alimentaria (que podrían llegar a ser más difíciles de controlar que brotes hospitalarios localizados).

Como se ha mencionado en la introducción de la Tesis Doctoral, el reciente desarrollo de técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos ha posibilitado profundizar y conocer con detalle la composición taxonómica y los determinantes genéticos de AMR de las poblaciones microbianas presentes en distintos eslabones de la cadena alimentaria. No obstante, aún es necesario avanzar en la integración de los datos aportados por las aproximaciones ómicas en esquemas de análisis de riesgos que permitan cuantificar y caracterizar el peligro. Además, su incorporación en sistemas rutinarios de monitorización de AMR también ayudará a tener una base de datos histórica, lo que facilitaría extraer tendencias temporales, evaluar la eficacia de nuevas medidas o prevenir problemas.

Al contrario que en el sector clínico, la cadena alimentaria tiene una mayor diversidad y complejidad de ambientes, microorganismos y agentes o tecnologías con potencialidad para determinar la respuesta bacteriana a los antimicrobianos. Por ello, es importante comprender las diferencias entre los distintos sectores alimentarios e identificar reservorios y factores de riesgo asociados a una mayor abundancia y dispersión de microorganismos resistentes y genes de resistencia en aras a diseñar estrategias exitosas para el control de la dispersión de la AMR.

Esta Tesis Doctoral busca profundizar en el conocimiento del problema que representa la resistencia a antibióticos en la cadena alimentaria. Analizándola directa e indirectamente a través de indicadores como: la resistencia a biocidas; la presencia de elementos genéticos móviles; o la existencia de cepas bacterianas persistentes, que pueden convertirse en un foco de diseminación de AMR.

Justificación y objetivos

El objetivo principal de la Tesis Doctoral es estudiar la contribución de distintos procesos de descontaminación de superficies y conservación de alimentos en la aparición y diseminación de AMR, evaluar la persistencia bacteriana en ambientes de procesamiento de alimentos y analizar la presencia de determinantes genéticos de AMR en distintos nichos ambientales en la industria alimentaria, extrayendo para ello información sobre el tipo de resistencias (familias de antibióticos y especie bacteriana de origen) y el riesgo de diseminación (si están localizadas en elementos genéticos móviles y/o bacterias persistentes en la industria alimentaria).

La consecución de este objetivo principal se ha logrado abordando los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar si dos tecnologías de descontaminación de superficies y conservación de alimentos (plasma atmosférico no térmico y luz ultravioleta) pueden propiciar la aparición de resistencias a antibióticos en la cadena alimentaria (Capítulo I).
- 2) Investigar si distintas condiciones de estrés y agentes biocidas pueden ejercer una presión selectiva que induzca la transferencia horizontal de determinantes genéticos de AMR (Capítulo II).
- 3) Monitorizar la colonización de ambientes de procesamiento de una industria cárnica por *Listeria monocytogenes*, además de caracterizar los aislados obtenidos mediante análisis de genoma completo (WGS) con el fin de comprender mejor la persistencia bacteriana de este patógeno alimentario, así como conocer su perfil de resistencia a antibióticos y biocidas, además de su potencial de virulencia (Capítulo III).
- 4) Llevar a cabo un estudio longitudinal de 18 meses de duración sobre la diversidad bacteriana y el resistoma (conjunto de determinantes genéticos de resistencia a antimicrobianos) en los ambientes de procesamiento de una planta recién construida que realiza labores de despiece y envasado de canales de cerdo. Se emplearon para ello técnicas dependientes (aislamiento y caracterización fenotípica de aislados) e independientes (secuenciación masiva de ADN metagenómico total) de cultivo (Capítulo IV).
- 5) Caracterizar la microbiota y el resistoma de los ambientes de procesamiento de alimentos de 25 industrias alimentarias de los sectores cárnico y lácteo, identificando los microorganismos más problemáticos, el tipo de resistencias a antimicrobianos que portan, así como si estas resistencias son transmisibles horizontalmente en caso de estar localizadas en elementos genéticos móviles (Capítulo V).

3. Resultados

Capítulo I

“Selection for antimicrobial resistance in foodborne pathogens through exposure to ultraviolet light and non-thermal atmospheric plasma decontamination techniques”.

Autores

*Adrián Álvarez Molina¹, María de Toro², Lorena Ruiz³,
Mercedes López^{1,4}, Miguel Prieto^{1,4},
Avelino Álvarez Ordóñez^{1,4}*

Revista

*Applied and Environmental Microbiology,
Volumen 86, Número 9
abril 2020*

DOI

<https://doi.org/10.1128/AEM.00102-20>

1. Department of Food Hygiene and Technology, Universidad de León, León, Spain
2. Plataforma de Genómica y Bioinformática, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain
3. Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC, Villaviciosa, Spain
4. Institute of Food Science and Technology, Universidad de León, León, Spain

Abstract

This study was aimed at assessing whether the repeated exposure of 12 strains of *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* to alternative nonthermal decontamination techniques with UV light (UV-C) and non-thermal atmospheric plasma (NTAP) may cause the emergence of variants showing increased resistance to clinically relevant antibiotics (ampicillin, cefotaxime, ciprofloxacin, colistin, erythromycin, gentamicin, streptomycin, tetracycline, and vancomycin). UV-C and NTAP treatments were applied on the surface of inoculated brain heart infusion (BHI) agar plates. Survivors were recovered and after 24 h of growth in BHI broth were again subjected to the decontamination treatment; this was repeated for 10 consecutive cycles. A total of 174 strain/decontamination technique/antibiotic combinations were tested, and 12 variant strains with increased resistance to one of the antibiotics studied were identified, with the increases in the MICs in Mueller-Hinton broth ranging from 2 to 256-fold. The variant strains of *Salmonella* spp. isolated were further characterized through phenotypic screenings and whole-genome sequencing (WGS) analyses. Most changes in susceptibility were observed for antibiotics that act at the level of protein synthesis (aminoglycosides, tetracyclines, and glycylicyclines) or DNA replication (fluoroquinolones), as well as for polymyxins. No changes in resistance to β -lactams were detected. WGS analyses showed the occurrence of sequence alterations in some antibiotic cellular targets (e.g., *gyrA* for ciprofloxacin-resistant variants, *rpsL* for a streptomycin-resistant variant), accompanied by variations in stress response regulators and membrane transporters likely involved in the nonselective efflux of antibiotics, which altogether resulted in a low to medium-level increase in microbial resistance to several antibiotics.

Artículo disponible en



<https://doi.org/10.1128/AEM.00102-20>

Capítulo I

Capítulo II

“Assessment of a plasmid conjugation procedure to monitor horizontal transfer of an extended-spectrum β -lactamase resistance gene”.

Autores

*Adrián Álvarez-Molina, Elena Trigo,
Miguel Prieto, Mercedes López,
Avelino Álvarez-Ordóñez*

Revista

Artículo no publicado

Abstract

Plasmids are relevant reservoirs of antimicrobial resistance genes (ARGs) which confer adaptive advantages to their host and can be horizontally transferred. The aims of this study were to develop a fast and efficient conjugation procedure which allows to monitor and quantify the horizontal transfer of a 193 kb plasmid containing the extended-spectrum β -lactamase production gene *bla*_{CTX-M-14} among two *Escherichia coli* strains. Furthermore, the influence of temperature (in the range 20 - 37 °C), pH (in the range 5.0 -9.0) and presence of some biocidal agents (benzalkonium chloride, sodium hypochlorite and peracetic acid) at subinhibitory concentrations on the efficacy of the gene transfer process was also assessed. The average conjugation rate obtained under control conditions (i.e., after co-culture in LB broth and through selective plating on agar plates supplemented with the antibiotics cefotaxime and streptomycin) was 2.09e-04. Conjugation rates were reduced at 20 °C and 30 °C, at alkaline pH (especially at pH 9.0) and in the presence of benzalkonium chloride, while peracetic acid and sodium hypochlorite slightly increased horizontal gene transfer rates, which reached 5.59e-04 and 6.77e-03, respectively. No significant differences in conjugation rates were observed when conjugation took place in a food matrix (cow's milk). The conjugation procedure here developed can be used in the future to identify risk scenarios leading to an enhanced ARGs transmission via plasmid conjugation, as well as to identify effective agents that can impair it and are, therefore, promising to be incorporated into novel intervention strategies tackling antimicrobial resistance.

Artículo no publicado

Capítulo II

Capítulo III

“Unraveling the emergence and population diversity of *Listeria monocytogenes* in a newly built meat facility through whole genome sequencing”.

Autores

*Adrián Álvarez-Molina*¹, *José F. Cobo-Díaz*¹, *Mercedes López*^{1,2},
Miguel Prieto^{1,2}, *María de Toro*³,
Avelino Álvarez-Ordóñez^{1,2}

Revista

International Journal of Food Microbiology, Elsevier.
Volumen 340, artículo 109043.
febrero 2021

DOI

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109043>

1. Department of Food Hygiene and Technology, Universidad de León, León, Spain
2. Institute of Food Science and Technology, Universidad de León, León, Spain
3. Genomics and Bioinformatics Core Facility, Biomedical Research Center of La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

Abstract

The food processing environments of a newly opened meat processing facility were sampled in ten visits carried out during its first 1.5 years of activity and analyzed for the presence of *Listeria monocytogenes*. A total of 18 *L. monocytogenes* isolates were obtained from 229 samples, and their genomes were sequenced to perform comparative genomic analyses. An increase in the frequency of isolation of *L. monocytogenes* and in the diversity of sequence types (STs) detected was observed along time. Although the strains isolated belonged to six different STs (ST8, ST9, ST14, ST37, ST121 and ST155), ST9 was the most abundant (8 out of 18 strains). Low (0 and 2) single nucleotide polymorphism (SNP) distances were found between two pairs of ST9 strains isolated in both cases 3 months apart from the same processing room (Lm-1267 and Lm-1705, with a 2 SNPs distance in the core genome; Lm-1265 and Lm-1706, with a 0 SNPs distance), which suggests that these strains may be persistent *L. monocytogenes* strains in the food processing environment. Most strains showed an *in silico* attenuated virulence potential either through the truncation of InlA (in 67% of the isolates) or the absence of other virulence factors involved in cell adhesion or invasion. Twelve of the eighteen *L. monocytogenes* isolates contained a plasmid, which ranged in size from 4 to 87 Kb and harbored stress survival, in addition to heavy metals and biocides resistance determinants. Identical or highly similar plasmids were identified for various sets of *L. monocytogenes* ST9 isolates, which suggests the clonal expansion and persistence of plasmid-containing ST9 strains in the processing environments of the meat facility. Finally, the analysis of the *L. monocytogenes* genomes available in the NCBI database, and their associated metadata, evidenced that strains from ST9 are more frequently reported in Europe, linked to foods, particularly to meat and pork products, and less represented among clinical isolates than other *L. monocytogenes* STs. It also showed that the ST9 strains here isolated were more closely related to the European isolates, which clustered together and separated from ST9 North American isolates.

Artículo disponible en



<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109043>

Capítulo III

Capítulo IV

“Microbial colonization and resistome dynamics in food processing environments of a newly opened pork cutting industry during 1.5 years of activity”.

Autores

José F. Cobo-Díaz^{1,}, Adrián Álvarez-Molina^{1,*}, Elena A. Alexa^{1,2,*}, Calum J. Walsh^{3,4}, Oscar Mencía-Ares⁵, Paula Puente-Gómez¹, Eleni Likotrafiti⁶, Paula Fernández-Gómez¹, Bernardo Prieto^{1,7}, Fiona Crispie³, Lorena Ruiz^{8,9}, Montserrat González-Raurich^{1,7}, Mercedes López^{1,7}, Miguel Prieto^{1,7}, Paul Cotter^{3,4}, Avelino Álvarez-Ordóñez^{1,7}*

* Autores principales del trabajo

Revista

*Microbiome, BMC.
Volumen 9, artículo 204.
octubre 2021*

DOI

<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>

1. Department of Food Hygiene and Technology, Universidad de León, León, Spain
2. Present address: Microbiology Department, National University of Ireland, Galway, Ireland
3. Teagasc Food Research Centre, Fermoy, Co. Cork, Ireland
4. APC Microbiome Ireland, University College Cork, Cork, Ireland
5. Department of Animal Health, Universidad de León, León, Spain
6. Department of Food Science & Technology, International Hellenic University, Thessaloniki, Greece
7. Institute of Food Science and Technology, Universidad de León, León, Spain
8. Dairy Research Institute, Spanish National Research Council, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-CSIC, Villaviciosa, Spain
9. MicroHealth Group, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011, Oviedo, Asturias, Spain

Abstract

Background: The microorganisms that inhabit food processing environments (FPE) can strongly influence the associated food quality and safety. In particular, the possibility that FPE may act as a reservoir of antibiotic-resistant microorganisms, and a hotspot for the transmission of antibiotic resistance genes (ARGs) is a concern in meat processing plants. Here, we monitor microbial succession and resistome dynamics relating to FPE through a detailed analysis of a newly opened pork cutting plant over 1.5 years of activity.

Results: We identified a relatively restricted principal microbiota dominated by *Pseudomonas* during the first 2 months, while a higher taxonomic diversity, an increased representation of other taxa (e.g., *Acinetobacter*, *Psychrobacter*), and a certain degree of microbiome specialization on different surfaces was recorded later on. An increase in total abundance, alpha diversity, and β -dispersion of ARGs, which were predominantly assigned to *Acinetobacter* and associated with resistance to certain antimicrobials frequently used on pig farms of the region, was detected over time. Moreover, a sharp increase in the occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and vancomycin-resistant *Enterococcaceae* was observed when cutting activities started. ARGs associated with resistance to β -lactams, tetracyclines, aminoglycosides, and sulphonamides frequently co-occurred, and mobile genetic elements (i.e., plasmids, integrons) and lateral gene transfer events were mainly detected at the later sampling times in drains.

Conclusions: The observations made suggest that pig carcasses were a source of resistant bacteria that then colonized FPE and that drains, together with some food-contact surfaces, such as equipment and table surfaces, represented a reservoir for the spread of ARGs in the meat processing facility.

Keywords: Metagenomics, Food processing environments, Antimicrobial resistance, Microbial ecology

Artículo disponible en



<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>

Capítulo IV

Capítulo V

“Antimicrobial Resistance in the food-industry microbiome landscape”.

Autores

*Adrián Álvarez-Molina, José F. Cobo-Díaz, Miguel Prieto,
Fiona Crispie, Paul Cotter, Mercedes López,
Avelino Álvarez-Ordóñez*

Revista

Artículo en preparación

Abstract

Microbiological control of food processing environments (FPE) is crucial to ensure food safety. This study assessed the microbiome and resistome of food contact and non food contact FPE from slaughterhouses (n=3), dairy (n=12) and meat (n=10) processing plants. In total 500 surface swabs were collected and pooled in 50 composite samples that were analysed through whole metagenome shotgun sequencing, which allowed to identify the main bacterial taxa and antimicrobial resistance genes (ARG) prevailing in these facilities. FPE from slaughterhouses had a more diverse microbiome and resistome, while FPE from dairy processing plants showed the highest β -dispersion, thus with a more heterogeneous microbiome and resistome. The predominant bacterial genera in FPE depended on the industry type, with *Pseudomonas* and *Psychrobacter* being highly dominant in surfaces from slaughterhouses and meat industries, while different lactic acid bacteria predominated in FPE from dairy industries. The most abundant ARG were associated with resistance to aminoglycosides, tetracyclines and quaternary ammonium compounds (QAC). Aminoglycosides and tetracyclines ARG were significantly more prevalent in slaughterhouses than in processing plants, while QAC resistance genes were particularly abundant in some food contact surfaces from dairy and meat processing plants, suggesting that daily sanitation under suboptimal conditions may be selecting in some facilities for persistent microbiota tolerant to these biocides. The taxonomic mapping of ARG pointed to specific bacterial genera such as *Escherichia*, *Bacillus*, or *Staphylococcus*, as carriers of the most relevant resistance determinants. About 63% of all ARG reads were assigned to contigs classified as plasmidic, evidencing that most ARG are transmissible and that the resistome of FPE may be strongly shaped through the spread of mobile genetic elements. Overall, the current study confirms the relevance of FPE as reservoirs of ARG and shows the benefits of integrating next generation sequencing technologies in antimicrobial resistance monitoring activities.

Keywords: food processing environments, antimicrobial resistance, metagenomics, resistome, microbiome.

Artículo en fase de escritura

4. Discusión general

4.1. La vigilancia de las resistencias a antimicrobianos en la cadena alimentaria

La amenaza que representa la AMR la ha situado dentro de los principales retos a resolver durante el siglo XXI por diversas organizaciones mundiales (WHO, 2009; FAO, 2015) y europeas (ECDC *et al.*, 2015). El aumento de las resistencias a antimicrobianos, junto con la desaceleración en el descubrimiento de nuevos antibióticos, arrojan perspectivas desalentadoras en caso de no actuar con rapidez para afrontar este reto.

En 2007, la *American Veterinary Medicine Association* (AVMA) formó un grupo de trabajo con el fin de potenciar la perspectiva *One Health*, de modo que profesionales y agencias colaborasen en el tratamiento y prevención de enfermedades humanas y animales (Zunino, 2018). Un año después, y a nivel global, la FAO, WHO y OIE adoptaron y comenzaron a promocionar este planteamiento integrador en la resolución de problemas sanitarios (Lee and Brumme, 2013). El enfoque *One Health* fue tenido en cuenta durante el desarrollo de los planes estratégicos destinados a combatir la AMR (FAO, 2015; WHO, 2015b). Más allá del foco puesto en el sector hospitalario y en el sector ganadero (caracterizados por la administración cotidiana de antibióticos), también se analizan los alimentos destinados al consumo humano o animal en los planes de vigilancia promovidos por las autoridades europeas (ECDC and EFSA, 2019, 2020; ECDC, 2020). Estos planes de vigilancia emplean métodos fenotípicos en los que se determina la susceptibilidad a distintos antimicrobianos de aislados bacterianos obtenidos bien de pacientes/animales enfermos o de lotes de productos alimentarios. Pero no existen programas destinados a monitorizar la AMR en los ambientes de procesado de las industrias alimentarias, a pesar de que pueden suponer un reservorio de microorganismos persistentes que pueden contaminar y llegar al alimento final.

4.2. Retos de la cadena alimentaria en cuanto a la monitorización de la AMR

El consumo de antibióticos obtenidos con receta médica o por prescripción veterinaria se encuentra hoy en día regulado por diversas autoridades (EMA, OIE). Sin embargo, el control de otros antimicrobianos más frecuentemente empleados por la industria alimentaria, como los biocidas de los programas industriales de limpieza y desinfección, es claramente menor. El paradigma de la vigilancia de bacterias resistentes a antibióticos en alimentos, animales o humanos es radicalmente diferente al de otros compartimentos de la cadena alimentaria. En el primero se acotan unidades discretas (X personas, animales o lotes de alimento) en las que se pretende detectar la presencia de microorganismos patógenos alimentarios que no deberían estar presentes, y en caso de estar presentes determinar su susceptibilidad a

determinados antimicrobianos de relevancia clínica. Sin embargo, la cadena alimentaria presenta una gran complejidad, principalmente asociada a los siguientes hechos:

- La dificultad de establecer en ocasiones unidades discretas de análisis, lo que, al mismo tiempo, complica el diseño de actuaciones concretas que remedien las causas responsables de la dispersión de bacterias portadoras de AMR.
- La gran diversidad microbiana, que posibilita que los determinantes genéticos de AMR están en muchas ocasiones asociados a bacterias comensales que no se vigilan, y que puedan transferir estas resistencias a patógenos alimentarios.
- La formación de biofilms por parte de determinadas bacterias, que puede dificultar su recuperación y detección en muestreos ambientales.
- El empleo de una gran multitud de sustancias con acción antimicrobiana o bactericida (biocidas, conservantes, edulcorantes u otros aditivos alimentarios) y de distintos tratamientos tecnológicos de conservación e higienización, para los que se desconoce el efecto que pueden provocar sobre la aparición y dispersión de AMR.

A continuación, se discute la información obtenida en los trabajos científicos desarrollados durante la Tesis Doctoral, que ha permitido llenar algunas de las lagunas de conocimiento que existían acerca del papel de la cadena alimentaria como reservorio y fuente de transmisión de AMR.

4.3. Biocidas y técnicas de conservación de alimentos y su relación con la AMR

En el capítulo I de la Tesis Doctoral, que formó la base de un artículo publicado en la revista *Applied and Environmental Microbiology*, se abordó el primer objetivo específico propuesto para esta Tesis: “Estudiar si dos tecnologías de descontaminación de superficies y conservación de alimentos (plasma atmosférico no térmico y luz ultravioleta) pueden propiciar la aparición de resistencias a antibióticos en la cadena alimentaria”.

El hecho de que algunos biocidas usados por las industrias alimentarias compartan dianas de actuación con antibióticos (Goudarzi, 2019), unido a la creciente preocupación por el problema de la AMR, ha fomentado en las últimas décadas el estudio de esta posible asociación por parte de la comunidad científica (Karatzas *et al.*, 2007, 2008; Webber *et al.*, 2015; Curiao *et al.*, 2016). En 2008 y 2009, el *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR) publicó dos informes (SCENHIR, 2008, 2009) en los que se analizó la información disponible acerca de la relación entre resistencia a biocidas y resistencia a antibióticos. En ellos se menciona la carencia de estudios *in situ* (en industria), la falta de normativa, la carencia de protocolos estándares para medir la eficacia

Discusión general

antibacteriana de los biocidas y se reconoce que, a pesar de las limitaciones de los estudios *in vitro*, existen indicios de una posible relación entre resistencia a biocidas y resistencia a antibióticos. Los efectos de los biocidas sobre las bacterias son múltiples y la aparición de co-resistencias depende, en gran medida, del biocida en cuestión, así como de la especie bacteriana, existiendo incluso variabilidad entre cepas concretas dentro de una misma especie (Braoudaki and Hilton, 2004; McBain *et al.*, 2004). El desarrollo y comercialización de nuevos biocidas en la Unión Europea, que se encuentra bajo el amparo de la *European Chemicals Agency* (ECHA), se rige por un documento base (EU, 2012) que menciona textualmente, sin aportar ninguna indicación sobre los métodos ni criterios que identifiquen los casos pertinentes:

“En caso pertinente, el organismo de evaluación evaluará la posibilidad de que el organismo objetivo desarrolle resistencia o resistencia cruzada a una sustancia activa del biocida”

Refiriéndose a la generación de resistencias a las sustancias activas del biocida, pero en ningún caso a la posible resistencia cruzada a antibióticos que pueda generar el biocida.

Aunque existen protocolos desarrollados por la *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) para la evaluación del uso de biocidas en materiales (OECD, 2007, 2013), la estandarización en la aprobación de compuestos activos para la formulación de biocidas de uso europeo entraña todavía dificultades. En un informe encargado en 2018 por la comisión europea sobre la implementación de la normativa 528/2012, que trata la regulación de productos biocidas, se detectaron diversas barreras que enlentecen la regulación de sustancias biocidas como la falta de personal, datos insuficientes a la hora de inscribir nuevos sustancias activas o una alta complejidad en el proceso de inscripción (European Commission, 2019). Si bien la comunidad científica avanza continuamente en el desarrollo de nuevos métodos para comprobar la eficacia de los biocidas (Knapp *et al.*, 2015), ya sea por los obstáculos mencionados previamente en el informe de la comisión europea o por la falta de coordinación entre organizaciones científicas y políticas, muchos de esos avances no llegan a incorporarse en la legislación con suficiente rapidez.

A raíz de la preocupación por el medioambiente y las posibles consecuencias no deseadas del uso de biocidas de origen químico, derivadas de la aparición de cepas resistentes o tolerantes a los mismos, la industria alimentaria continúa buscando nuevas tecnologías de descontaminación bacteriana de superficies y/o alimentos que sean más sostenibles y seguras (Ölmez and Kretzschmar, 2009; Meireles *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2020). Dos de estas tecnologías, en fase de implantación en la industria alimentaria, son la luz ultravioleta (UV), empleada en el tratamiento de agua y desinfección de superficies (Oliveira *et al.*, 2020), y el

Discusión general

plasma atmosférico no térmico (NTAP), con potencial tanto para la conservación de alimentos como para la descontaminación de superficies (López *et al.*, 2019; Calvo *et al.*, 2020).

En el **capítulo I** se extrajeron resultados de gran interés sobre el efecto que la exposición repetida de varios patógenos alimentarios (*E. coli*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.) a 10 ciclos subletales de tratamiento con estas dos tecnologías ejercía sobre su posterior resistencia a diversos antibióticos de importancia clínica (ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, colistina, eritromicina, estreptomina, gentamicina, tetraciclina y vancomicina). Se detectaron variantes con fenotipo de susceptibilidad reducida a alguno de los antibióticos empleados en 12 de las 174 combinaciones bacteria/tecnología/antibiótico estudiadas. Estas variantes mostraban un incremento en su resistencia a antibióticos aminoglicósidos, fluoroquinolonas, polimixinas o tetraciclinas. Aunque se aplicaron diez ciclos consecutivos de tratamiento a intensidad subletal, no se detectó una respuesta de tolerancia significativa a la propia tecnología (Figura 1, capítulo I). Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria de la tetraciclina en agar llegó a aumentar hasta 256 veces en una cepa de *E. coli*. (Tabla 1, capítulo I).

Aunque se partió tan solo de 3 cepas distintas de *L. monocytogenes*, la mitad de las variantes obtenidas provenían de esta especie bacteriana. La aparición de resistencias a antibióticos a causa del estrés provocado por tratamientos físicos, como bajas temperaturas, o químicos, como la acidificación del medio, ha sido advertida previamente por la comunidad científica (McMahon *et al.*, 2007; Verraes *et al.*, 2013a). En el caso de *L. monocytogenes*, una bacteria capaz de persistir durante años en las plantas de procesado de alimentos (Orsi *et al.*, 2008; Holch *et al.*, 2013), la aplicación continuada de estos agentes y tecnologías de desinfección o descontaminación de superficies podría provocar la acumulación de diversas mutaciones adaptativas que podrían llegar a ocasionar la dispersión de AMR. La posibilidad de que este microorganismo acumule estos determinantes de resistencia se estudia con mayor profundidad en el capítulo III, en el que se analizó detalladamente, mediante secuenciación del genoma completo, 18 cepas de *L. monocytogenes* de origen industrial (algunas de ellas persistentes). Más adelante se discutirán los resultados obtenidos en dichos análisis.

De las 12 variantes bacterianas que mostraron un incremento importante en su AMR, se decidió estudiar únicamente el perfil de resistencia frente a un amplio panel de antimicrobianos y el genoma completo de las 4 obtenidas para *Salmonella* spp., en base a su alta incidencia en la Unión Europea, como recogen los informes sobre enfermedades zoonóticas publicados anualmente por EFSA (ECDC and EFSA, 2018). En estos análisis se pudo observar que las variantes mostraban un incremento de la resistencia a ciprofloxacina (fluoroquinolona que inhibe la replicación del ADN) y/o a antibióticos que actúan en el ribosoma, inhibiendo la

Discusión general

síntesis proteica. Tal como se señala en el informe de SCENHIR (2009), los principales mecanismos responsables de estas resistencias fueron mutaciones puntuales en la diana de actuación o en sistemas de bombeo activo del antibiótico mediante bombas de eflujo. Así, se detectaron mutaciones puntuales en el gen *gyrA*, que codifica para la topoisomerasa, diana de actuación de la ciprofloxacina, habiéndose descrito distintas variantes de este gen que confieren una mayor tolerancia a dicho antibiótico (Fu *et al.*, 2013). Se detectaron también mutaciones puntuales en dos genes (*rrsH* y *rpsL*) que codifican proteínas ribosomales. La mutación de estos genes y su implicación en fenotipos de resistencia a aminoglucósidos como la estreptomicina han sido previamente descritas en otros trabajos (Oikkola *et al.*, 2010; Zankari *et al.*, 2017). En la variante denominada 3-EVOL, que sufrió una mutación en el regulador *soxR*, la adición del inhibidor de bombas de eflujo PA β N aumentó la eficacia de la ciprofloxacina, logrando reducir 4 veces la concentración mínima inhibitoria (comparando con la ausencia del inhibidor). El PA β N es un inhibidor que bloquea las bombas de eflujo de la familia *resistance nodulation division* (RNS) (Opperman and Nguyen, 2015), que podrían estar sobre expresadas a causa de la mutación en el regulador de respuesta a estrés oxidativo *soxR* (Bialek-Davenet *et al.*, 2011).

Con estos ensayos **se alcanzó el primer objetivo de la Tesis Doctoral**, revelando y caracterizando la aparición de variantes bacterianas resistentes a antibióticos, asociadas al empleo sub-óptimo de nuevas tecnologías de descontaminación de superficies y alimentos. Las resistencias generadas son de localización cromosómica, por tanto, más difíciles de transmitir que aquellas transportadas en elementos genéticos móviles, de las cuales se hablará en más detalle al discutir los resultados del capítulo II. En cualquier caso, los resultados obtenidos sugieren la necesidad de validar estrategias de desinfección que sean eficientes a la hora de reducir la contaminación microbiana sin contribuir a la dispersión de AMR. Es posible que una combinación inteligente de biocidas con otras tecnologías de descontaminación, como la luz ultravioleta y el plasma atmosférico no térmico, sirva para el control de la higiene de las plantas de procesado minimizando el problema de la AMR al dificultar la aparición de bacterias que puedan resistir y adaptarse a distintas condiciones de estrés (Meireles *et al.*, 2016).

4.4. Efecto de las condiciones de estrés en la transferencia horizontal de AMR

En el capítulo II de la Tesis Doctoral, que formó la base de un artículo recientemente enviado para su publicación a una revista de prestigio en el área de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, se abordó el segundo objetivo específico propuesto para esta Tesis:

Discusión general

“Investigar si distintas condiciones de estrés y agentes biocidas pueden ejercer una presión selectiva que induzca la transferencia horizontal de determinantes genéticos de AMR”.

La exposición a biocidas (Karatzas *et al.*, 2007, 2008) o a otras condiciones de estrés prevalentes en la cadena alimentaria, como acidificación o estrés salino (McMahon *et al.*, 2007; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2015), puede incrementar la resistencia bacteriana a los antibióticos. El aumento de la resistencia a los antibióticos puede ser transitorio (adaptativo) o permanente (cambios genéticos). En el caso de los cambios genéticos, la resistencia a antibióticos puede ser causada por polimorfismos o por otros cambios puntuales a nivel de la secuencia de ADN, como se ha descrito en el capítulo I, o bien por la incorporación de nuevos genes que confieran resistencia, adquiridos por transferencia horizontal (Lerminiaux and Cameron, 2019; Sun *et al.*, 2019). Los cambios en dianas de actuación suelen proteger sólo frente a ciertos tipos de antibiótico (SCENHIR, 2008) como las quinolonas, macrólidos, lincosamidas o estreptograminas, y el riesgo de dispersión por la cadena alimentaria de estas resistencias a antibióticos es limitado. Por otro lado, el riesgo de dispersión asociado a las resistencias transmitidas de forma horizontal mediante elementos genéticos móviles es mucho mayor (McMillan *et al.*, 2019), ya que pueden ser transferidas a otros géneros bacterianos e incluso co-seleccionarse junto a genes de resistencia a biocidas (Verraes *et al.*, 2013a; Hudson *et al.*, 2017).

La exposición de microorganismos a condiciones de estrés incrementa la expresión de sus reguladores globales de respuesta a estrés, como *crc*, *soxR*, o *rpoS* (Chen, 2017), lo que activa cascadas de señalización que pueden afectar a la permeabilidad de la membrana bacteriana a distintos antibióticos o a su capacidad de expulsión de tales moléculas a través de bombas de eflujo (Cabral *et al.*, 2018). Más recientemente se han publicado varios estudios científicos que relacionan a distintas moléculas empleadas en la práctica clínica cuya principal función no es antibacteriana, como antiinflamatorios (Verma *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020) o antiepilépticos (Wang *et al.*, 2019), con la dispersión de resistencias a antibióticos a través de la inducción de la transferencia horizontal por conjugación de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos. En la industria alimentaria también existen indicios de que algunos compuestos, como aditivos conservantes en piensos animales (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2013) o edulcorantes (Dalkilic *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021), pueden fomentar la transferencia horizontal de genes de resistencia. No obstante, aún existen importantes lagunas de conocimiento sobre el efecto ejercido por los aditivos, conservantes y otros agentes antimicrobianos, así como por las condiciones de estrés en la dispersión de la AMR por fenómenos de conjugación de elementos móviles (Cen *et al.*, 2020).

Discusión general

Dado que la cantidad y diversidad de genes de resistencia a antimicrobianos han sido positivamente correlacionadas con la abundancia de elementos genéticos móviles (Moser *et al.*, 2018), la aplicación a intensidades subletales de tratamientos desinfectantes o la exposición a otros agentes estresantes, podrían, por tanto, favorecer la dispersión de genes de resistencia (Baharoglu *et al.*, 2010; Headd and Bradford, 2018) como su diversidad, ya que se ha demostrado que la exposición a condiciones de estrés incrementa la capacidad de captación de genes de resistencia por parte de integrones y la movilidad de transposones (Andersson and Hughes, 2014).

En el capítulo I de esta Tesis Doctoral se ha discutido cómo las presiones selectivas impuestas por la exposición a condiciones subletales de estrés pueden promover la aparición de mutaciones asociadas a la dispersión de variantes bacterianas con susceptibilidad reducida a los antibióticos. El **capítulo II** de esta Tesis doctoral se centró en estudiar su efecto sobre la transferencia horizontal de genes de resistencia a antimicrobianos. Para ello, se desarrolló un protocolo de conjugación de un plásmido portador de un gen que codifica para una β -lactamasa de espectro extendido (ESBL) entre cepas de *E. coli*.

El protocolo de conjugación se desarrolló co-cultivando una variante resistente a la estreptomicina de la cepa de referencia, *E. coli* CECT-516, con la cepa donante portadora del plásmido, *E. coli* HV40, inicialmente aislada de leche de cabra. El co-cultivo tiene lugar durante 18 h a 37°C en medio líquido, caldo Luria-Bertani (LB) o leche, con una ratio donante:receptor de 1:1 y en ausencia de agitación. La tasa media de transferencia en caldo LB fue de $2,09 \times 10^{-4}$, lo que implica que 1 de cada 4.785 bacterias receptoras captaría el plásmido de la cepa donante. En 2008, un metaanálisis llevado a cabo por Hunter *et al.* (2008) analizó 128 tasas de conjugación. Mediante la aplicación de modelos lineales los autores concluyeron que la transmisión horizontal entre bacterias Gram negativas era 2 unidades logarítmicas más probable que entre bacterias Gram positivas. Años después, Alderliesten *et al.* (2020) realizaron un nuevo metaanálisis en el que evaluaron el efecto que ejercían diferentes variables (temperatura, agitación, parentesco entre donante y receptor, etc.) sobre las tasas de transferencia de 583 ensayos de conjugación distintos. En este estudio observaron la existencia de fenómenos de conjugación entre bacterias alejadas filogenéticamente y que los soportes sólidos (filtros) daban lugar a tasas de transferencia ligeramente superiores a las obtenidas en medio líquido, además de que la agitación del cultivo permitía aumentar en una unidad logarítmica las tasas de transferencia obtenidas.

A pesar de estos antecedentes, se decidió validar el protocolo previamente mencionado en el que la conjugación tiene lugar en medio líquido, sin agitación y con poblaciones bacterianas en estado planctónico. Esta decisión se basó en que los sistemas líquidos ofrecen facilidades

Discusión general

a la hora de poder miniaturizar los co-cultivos y poder escalar, mediante dispositivos de microfluídica, el análisis del efecto de múltiples agentes o condiciones ambientales (Qiu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Hernandez-Beltran *et al.*, 2021). Además, como se discutirá más adelante en el capítulo IV, algunos nichos ambientales de las industrias de procesado de alimentos, como los representados por el agua residual de los desagües, presentan características similares. Los desagües son reservorios con una alta diversidad microbiana y abundancia tanto de genes de resistencia como de elementos genéticos móviles (Capita and Alonso-Calleja, 2013; Weingarten *et al.*, 2018; Oniciuc *et al.*, 2019).

La aplicación del protocolo desarrollado para evaluar la influencia de la temperatura y pH del medio, así como de la exposición a concentraciones subletales de distintos agentes biocidas permitió **alcanzar el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral**. La información disponible en la literatura muestra que la transferencia horizontal de plásmidos está regulada por distintos mecanismos y depende de múltiples factores que condicionan el estado fisiológico bacteriano (Frost and Koraimann, 2010; Headd and Bradford, 2018, 2020; Saliu *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en el capítulo II demuestran que la temperatura de cultivo determinó las tasas de conjugación obtenidas. De las tres temperaturas evaluadas (20, 30 y 37 °C) únicamente se detectaron transconjugantes a 37°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Headd and Bradford (2018), que describieron tasas muy bajas de conjugación a temperaturas inferiores a 37 °C. En cuanto al pH del medio, su alcalinización redujo (pH = 8) o inhibió por completo (pH = 9) la transferencia horizontal del plásmido, lo que explicaría que el máximo pH incluido en el metaanálisis de Alderliesten y colaboradores fuese pH = 8. En lo que respecta a la presencia de concentraciones residuales de biocidas durante el co-cultivo, el cloruro de benzalconio inhibió por completo la conjugación, el hipoclorito sódico aumentó la tasa de transferencia horizontal y el ácido peracético no mostró efectos significativos.

Tanto la falta de estandarización en las cepas y protocolos empleados en ensayos de conjugación (Johnsen and Kroer, 2007), como el escaso acceso a plataformas de microfluídica, son barreras a superar en los próximos años a la hora de llevar a cabo estudios sistemáticos que permitan identificar factores de riesgo asociados a una mayor transferencia horizontal de genes de resistencia o diseñar estrategias capaces de inhibirla. También se prevé que la adopción de técnicas de secuenciación masiva de ADN permita evaluar *in situ* los eventos de transferencia horizontal que sucedan en los ambientes industriales, de forma que esta información pueda integrarse en esquemas de análisis de riesgos, lo que facilitará un mejor aseguramiento de la seguridad alimentaria.

4.5. Persistencia de *Listeria monocytogenes* en ambientes de procesado de alimentos

En el capítulo III de la Tesis Doctoral, que formó la base de un artículo publicado en la revista *International Journal of Food Microbiology*, se abordó el tercer objetivo específico propuesto para esta Tesis:

“Monitorizar la colonización de ambientes de procesado de una industria cárnica por *Listeria monocytogenes*, además de caracterizar los aislados obtenidos mediante análisis de genoma completo (WGS) con el fin de comprender mejor la persistencia bacteriana de este patógeno alimentario, así como conocer su potencial de virulencia junto con su perfil de resistencia a antibióticos y biocidas.”

Listeria monocytogenes es un patógeno alimentario de gran relevancia, a pesar de no ser considerado una bacteria preocupante desde el punto de vista de la resistencia a los antimicrobianos. De hecho, no aparece en la lista de microorganismos de importancia crítica por su alta resistencia a los antibióticos (WHO, 2017a). Este hecho no le resta importancia pues aparece en los informes de enfermedades zoonóticas publicados por ECDC y EFSA (ECDC and EFSA, 2021a) como la quinta causa más frecuente de infección transmitida por alimentos, con 2621 casos en la Unión Europea en 2019 (último año analizado en los reportes de la EFSA). En este año, la cifra de hospitalizaciones causadas por *L. monocytogenes* fue de 1234 personas y, lamentablemente, produjo el deceso de 300 personas. Estas cifras convierten a *L. monocytogenes* en el patógeno alimentario que más muertes causó en la Unión Europea en 2019. En referencia a España ha de hacerse una mención especial al incidente sucedido en Andalucía durante el verano de 2019, relacionado con la presencia del patógeno en carne mechada. Fue uno de los mayores brotes alimentarios producidos en la última década en el país, afectando a 225 personas, de las cuales 131 necesitaron hospitalización, y causó la pérdida de 3 vidas humanas.

De las 56070 muestras de productos cárnicos y alimentos listos para el consumo analizadas en el informe de EFSA, aproximadamente la mitad (51,4%) pertenecían a productos relacionados con el sector porcino. De los productos de origen porcino el 2,1% de las muestras estaban contaminadas con *L. monocytogenes*, mientras que, de las 1634 muestras de productos cárnicos listos para el consumo, un 2,9% fueron positivas, indicando la alta prevalencia del patógeno en este tipo de alimentos. En la Figura 9 se muestran algunos datos extraídos del informe sobre la gravedad de notificaciones del sistema europeo *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) (RASFF, 2021), así como los principales grupos de alimentos implicados en notificaciones relacionadas con *L. monocytogenes*. En 2018, el panel

Discusión general

BIOHAZ de EFSA publicó una opinión científica sobre el riesgo de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (BIOHAZ EFSA panel, 2018), advirtiendo que las principales causas de contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* son la existencia de prácticas de higiene deficientes (Aalto-Araneda *et al.*, 2019) y la gran capacidad de persistencia de este microorganismo, relacionada, en parte, con su tolerancia a biocidas y desinfectantes (Ortiz *et al.*, 2016). Por los motivos que se acaban de mencionar se decidió centrar este capítulo en estudiar la paulatina aparición y persistencia de *L. monocytogenes* en una industria cárnica recién construida ligada al sector porcino. El estudio, que comenzó tras la finalización de las obras de construcción y se extendió durante 18 meses de actividad, buscó analizar, mediante el análisis del genoma completo de los aislados de *L. monocytogenes* obtenidos, los determinantes genéticos de este patógeno referentes a su resistencia a antimicrobianos y biocidas, conjuntamente con su tolerancia a estrés, tanto a nivel cromosómico como en elementos genéticos móviles.

Discusión general

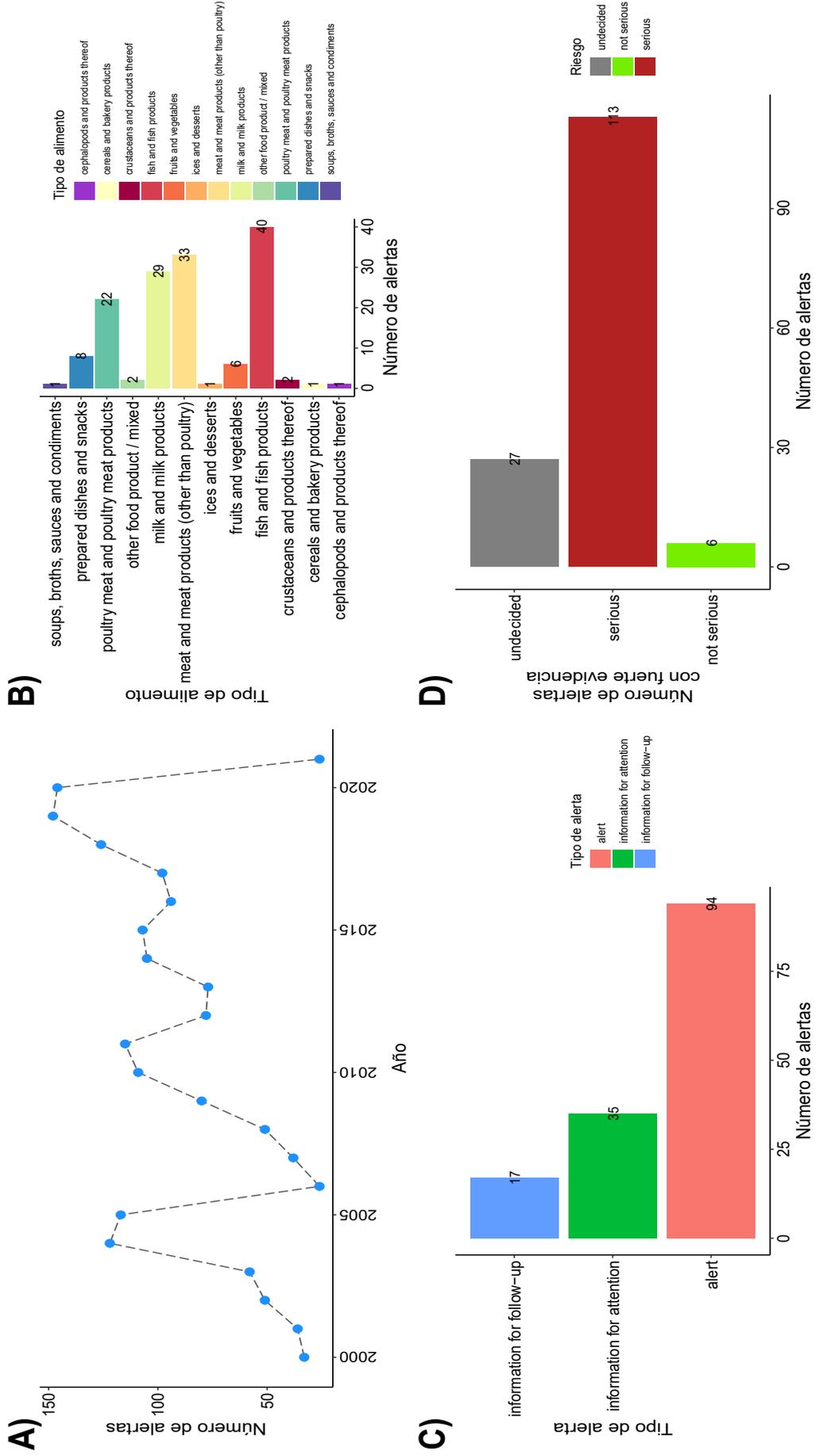


Figura 1 de la discusión general: Incidencias del RASFF relacionadas con *L. monocytogenes*:

A) Evolución de alertas a lo largo de los últimos 20 años.

B) Tipo de alerta, llamada de atención (verde), seguimiento de llamada de atención (azul), o alerta (rosa).

C) Categorías de alimentos implicados en alertas causadas por *L. monocytogenes*

D) Nivel de gravedad de las alertas, sin decisión (gris), no serio (verde), serio (rojo)

Discusión general

L. monocytogenes suele estar presente en las superficies industriales en baja concentración y/o en forma de biofilms, por lo que su detección es muchas veces difícil (Gião *et al.*, 2015) y requiere de enriquecimientos selectivos. Durante los 18 meses de muestreo se encontró *L. monocytogenes* en 18 superficies (de un total de 229). El primer aislado se detectó una semana después de la introducción de materias primas (canales de cerdo) en la instalación (capítulo III, Figura 1B). Como se detallará más adelante, en la discusión de los resultados del siguiente capítulo (capítulo IV, Figura S4), en ese momento el microbioma industrial sufrió grandes cambios tras la entrada de la carne y el inicio de las actividades de faenado.

Los aislados se agruparon en 6 genotipos (*sequence types* - ST) distintos (capítulo III, Figura 1B) a partir de un esquema MLST consistente en 7 locus. Con el avance del tiempo, *L. monocytogenes* se extendió por la industria, resultando su detección cada vez más frecuente. La diversidad de genotipos observados también aumentó a lo largo del estudio, coincidiendo con un incremento de la diversidad del microbioma, que se discutirá en el siguiente capítulo. La agrupación en distintos ST coincidió con una agrupación basada en *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), como se puede observar en la Figura 1C del capítulo III. Se realizó un estudio comparativo evaluando el *core genome* (CG) de ocho aislados del ST9 encontrados en la industria alimentaria junto a 352 genomas de *L. monocytogenes* ST9 disponibles en la base de datos del NCBI aplicando el esquema de Moura *et al.* (2016). En la agrupación de estos genomas se observó que los genomas de origen norteamericano diferían de los aislados europeos, junto con una fuerte asociación entre el ST9 e industrias y productos cárnicos (capítulo III, Figura 5).

Sólo se detectaron 4 genes de resistencia a antibióticos en todas las bacterias aisladas. Estos genes de resistencia poseían poca capacidad de transmisión horizontal dada su localización en el cromosoma bacteriano. Estudios fenotípicos de susceptibilidad de aislados de *L. monocytogenes* a antimicrobianos (Noll *et al.*, 2018) corroboran que, si bien este patógeno puede adquirir resistencias a antibióticos, sigue siendo susceptible a un amplio rango de antibióticos útiles para tratar su infección (Olaimat *et al.*, 2018). En los aislados recuperados durante este trabajo los genes de resistencia detectados se relacionan con la resistencia frente a quinolonas, lincomicina y fosfomicina.

Todos los aislados portaban la isla genómica LIPI-1 (capítulo III, Figura 2), que codifica 5 genes relacionados con la invasión celular. Afortunadamente, ninguno portaba las islas LIPI-3 y LIPI-4, ligadas a una mayor virulencia de los aislados de origen clínico (Maury *et al.*, 2016). El gen responsable de codificar la internalina A, el mayor indicador de virulencia según Maury *et al.* (2016), estaba truncado en el 67% de los aislados. Además, cabe destacar que no se

Discusión general

encontró ningún determinante de virulencia en los plásmidos que portaban estos aislados bacterianos. En un estudio realizado en embriones de pez cebra se evidenció una mayor virulencia cuando una cepa de *L. monocytogenes* portaba el plásmido pLMST6 (Kropac *et al.*, 2019), aunque los propios autores señalaron que fueron incapaces de determinar los genes realmente implicados en el aumento de la virulencia.

Por otra parte, también se pudo comprobar que los determinantes genéticos de resistencia al estrés difirieron entre los distintos ST. En el cromosoma, todos los aislados compartieron un grupo de 5 genes relacionados con la tolerancia al pH ácido, bombas de eflujo y otros mecanismos como resistencia a triclosán. Las dos islas genómicas de tolerancia a estrés SSI-1 y SSI-2 se distribuyeron desigualmente en los distintos ST, dando indicios de una divergencia evolutiva en cuanto a tolerancia a estrés por parte de los distintos ST. Estos determinantes contribuyen a la adaptación y persistencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de procesado de diversas maneras (capítulo III, Tabla 2). La isla SSI-1 estuvo presente en dos parejas de cepas (Lm-1265 y Lm-1706; Lm-1267 y Lm-1705) que se aislaron con 3 meses de diferencia de las mismas salas de procesado.

Los análisis realizados indicaron que los plásmidos son también de gran importancia en la adaptación de *L. monocytogenes* al inhóspito entorno industrial. De los 12 plásmidos encontrados, 4 fueron caracterizados como plásmidos conjugativos, representando un riesgo por su capacidad de transmitir horizontalmente las numerosas resistencias a metales pesados, biocidas y otras condiciones de estrés (capítulo III, Figura 4) a otras cepas que podrían convertirse en persistentes. Se analizó la similitud genética de los plásmidos recuperados de la industria cárnica con plásmidos de referencia asociados a *L. monocytogenes* presentes en la base de datos del NCBI. El plásmido encontrado en la cepa sospechosa de ser persistente, compuesta por la pareja de aislados persistentes Lm-1265 y Lm-1706 (capítulo III, Tabla 2) portó genes de resistencia a cloruro de benzalconio (BAC). Este biocida es ampliamente usado por la industria alimentaria, habiéndose descrito la capacidad de *L. monocytogenes* para desarrollar resistencias frente a este compuesto. El plásmido portado por la otra cepa persistente, compuesta por los aislados Lm-1267 y Lm-1705, se agrupó en un clúster junto con otro plásmido (presente en Lm-570 y Lm-1262) que solo se diferenciaba en un fragmento de 9 kb que codifica proteínas relacionadas con la reparación de daños causados por la luz ultravioleta.

Ninguno de los plásmidos encontrados en las cepas persistentes fueron conjugativos. Pero sí se observaron grupos de plásmidos en los que el ST de su hospedador es único, como en el caso de los plásmidos de los clúster A, B y C en los que el hospedador siempre perteneció al ST9, o de los plásmidos del clúster E, cuyo hospedador se clasificó como ST121. En el

informe de EFSA (BIOHAZ EFSA panel, 2018) sobre *L. monocytogenes* y alimentos listos para el consumo, se indica que, de 6.000 aislados obtenidos de muestras clínicas y alimentarias, el 80% de los aislados pertenecían a 12 complejos clonales (CC). De los complejos clonales relacionados con alimentos, el CC9 y el CC121 fueron los mayoritarios. La identificación de ciertas familias de plásmidos que aparecen exclusivamente en estos dos complejos clonales podría, al menos en parte, ser la responsable de su amplia distribución en ambientes de procesado de alimentos y en los propios alimentos.

En resumen, se ha confirmado la capacidad de *L. monocytogenes* para persistir en ambientes de procesado de alimentos y se han podido detectar tanto genotipos como determinantes genéticos posiblemente relacionados con esa habilidad de persistir, **alcanzando con ello el tercer objetivo de la Tesis Doctoral.**

4.6. Estudio de las dinámicas temporales en el microbioma y resistoma industriales

En el capítulo IV de la Tesis Doctoral, que formó la base de un artículo publicado en la revista *Microbiome*, se abordó el cuarto objetivo específico propuesto para esta Tesis:

“Llevar a cabo un estudio longitudinal de 18 meses de duración sobre la diversidad bacteriana y el resistoma (conjunto de determinantes genéticos de resistencia a antimicrobianos) en los ambientes de procesado de una planta recién construida que realiza labores de despique y envasado de canales de cerdo. Se emplearon para ello técnicas dependientes (aislamiento y caracterización fenotípica de aislados) e independientes (secuenciación masiva de ADN metagenómico total) de cultivo”

El capítulo IV estudia detalladamente la evolución de las bacterias presentes en la microbiota industrial junto a los cambios temporales en el conjunto de genes de resistencia a antimicrobianos durante los 18 primeros meses de actividad de la misma industria cárnica analizada en el capítulo III, centrado en la persistencia de *L. monocytogenes*.

Además de estudiar en detalle los determinantes de AMR asociados a determinados grupos bacterianos de importancia clínica (*Enterobacterias* resistentes a beta-lactámicos de espectro extendido, *Pseudomonas* resistentes a beta-lactámicos de espectro extendido y carbapenemasas, *Staphylococcus* resistentes a la meticilina y *Enterococcus* resistentes a vancomicina), también se llevaron cabo análisis metagenómicos de secuenciación masiva, lo que permitió ampliar el análisis de AMR gracias a que no dependen de que los microorganismos puedan cultivarse (Forbes *et al.*, 2017; Álvarez-Molina *et al.*, 2020). La metagenómica total o tipo *shotgun* (Quince *et al.*, 2017) aporta datos sobre la diversidad taxonómica (riqueza o α -diversidad) y la equitatividad de los taxones presentes (índice de

Discusión general

Simpson) dentro de una misma muestra, conjuntamente con información sobre la diversidad taxonómica entre distintas muestras de un mismo grupo (β -diversidad). Tiene la ventaja respecto a la secuenciación de genes con relevancia taxonómica, como el gen 16S rRNA, de que no sólo se obtiene información taxonómica, sino que también permite predecir la funcionalidad de la comunidad microbiana mediante el análisis de la abundancia y diversidad de genes asociados con determinados fenotipos, como es el caso de los genes de resistencia (resistoma), los genes de virulencia (viruloma) o el conjunto de elementos genéticos móviles (moviloma), entre otros (Campos Calero *et al.*, 2018; Carr *et al.*, 2021).

De nuevo, en este ámbito, el sector clínico avanza a mayor velocidad que el sector alimentario. En este sentido, se está realizando un gran esfuerzo investigador en el estudio de la microbiota humana, evaluando, por ejemplo, cómo sus cambios se asocian con distintas enfermedades o de qué manera ciertas actuaciones cuyo objetivo es modular la microbiota intestinal, como los trasplantes fecales o el uso de probióticos y prebióticos pueden revertir esas patologías (Garza-González *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2020). De forma análoga a los avances realizados en los proyectos sobre el microbioma humano (Proctor *et al.*, 2019), analizar microbiotas industriales “sanas” (entendiendo como una industria sana aquella que tenga bajo control la presencia de bacterias patógenas persistentes y/o resistentes a distintos antimicrobianos en las instalaciones, evitando su llegada al producto final) permitiría identificar bacterias o géneros clave para la modulación de las comunidades microbianas en ambientes industriales. De hecho, siguiendo con la homología del microbioma humano, el análisis de datos históricos de una misma empresa facilitaría la identificación de cambios que precediesen a estados de “enfermedad”, entendiendo como enfermedad, en este caso, el estado de la microbiota en distintas superficies en el momento en que se producen alteraciones que comprometan la inocuidad alimentaria.

La implantación de las técnicas metagenómicas en la vigilancia rutinaria de los ambientes de procesado de alimentos permitiría obtener un gran volumen de datos que podrían ser incorporados en esquemas de análisis de riesgos o, incluso, ser utilizados para predecir y prevenir consecuencias negativas como la instauración de microorganismos patógenos persistentes o la contaminación microbiana del producto final (Zhou and Gallins, 2019). Dado que la metagenómica no tiene en cuenta el estado de viabilidad de los microorganismos (BIOHAZ EFSA panel, 2019), el empleo de estudios de metatranscriptómica será un aspecto clave en un futuro para ampliar la información y comprender mejor el “estado de salud” de la microbiota industrial (Lugli *et al.*, 2019). No obstante, en ningún caso se prevé que los estudios de metagenómica y metatranscriptómica lleguen a sustituir totalmente a los análisis microbiológicos por métodos clásicos en planta, ya que estos últimos posibilitan aislar microorganismos problemáticos y conocerlos en mayor detalle (Pitkäranta *et al.*, 2008;

Discusión general

Rantsiou *et al.*, 2018; De Filippis *et al.*, 2021), pero sí que indicarán con mayor precisión qué superficies o áreas de la industria habría que muestrear con mayor frecuencia.

A continuación, se comentan y discuten los hallazgos más importantes obtenidos durante el estudio longitudinal llevado a cabo en el capítulo IV.

En relación a los aislados bacterianos recuperados de la industria cárnica, como se puede observar en la Figura 1 de la discusión general, se obtuvieron más aislados de las superficies de no contacto con el alimento, salvo en el caso de *Staphylococcus*. En cuanto a aislados resistentes a antibióticos, los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Enterococcus* provenían mayoritariamente de superficies de no contacto con los alimentos. *Pseudomonas* mostró un patrón opuesto, en el que los aislados provenientes de superficies en contacto con el alimento resultaron más resistentes que los recuperados de superficies en no contacto con el alimento. Se realizaron paneles de susceptibilidad a antimicrobianos para 58 aislados de *Enterococcus* obtenidos de los diferentes períodos de muestreo (capítulo IV; Figura 5B y 5C), detectándose mayor número de aislados multirresistentes (MDR) en las últimas etapas del estudio longitudinal, que poseían resistencias a eritromicina, cloranfenicol, quinupristina-dalfopristina y tetraciclina. Estas resistencias mostraron una correlación positiva entre sí, apuntando a la existencia de determinantes genéticos como integrones o plásmidos en las que se transmitan conjuntamente (García-Migura *et al.*, 2011).

El patrón en el número de superficies de las que se pudieron recuperar aislados con resistencia a antibióticos de importancia clínica a lo largo del tiempo (capítulo IV, Figura 5A) evidencia que, en el momento en que comenzaron la entrada de canales y las actividades de faenado de la carne en la instalación, se produjo un incremento muy importante en la detección de enterobacterias resistentes a beta-lactámicos de espectro extendido, y al mismo tiempo, de *Enterococcus* resistente a la vancomicina. Por su parte, la abundancia total de genes de resistencia a antimicrobianos determinada mediante metagenómica (capítulo IV, Figura 3A), aumentó progresivamente durante los 18 meses de actividad. Los patrones de AMR obtenidos a través de técnicas dependientes e independientes de cultivo no coincidieron plenamente. Este comportamiento se podría atribuir a diversos factores, incluyendo el muestreo aleatorio o al hecho de que las técnicas microbiológicas de enriquecimiento permitan recuperar microorganismos presentes en baja concentración, estando, consecuentemente, poco o nada representados en las secuencias obtenidas por metagenómica (Lugli *et al.*, 2019).

Discusión general

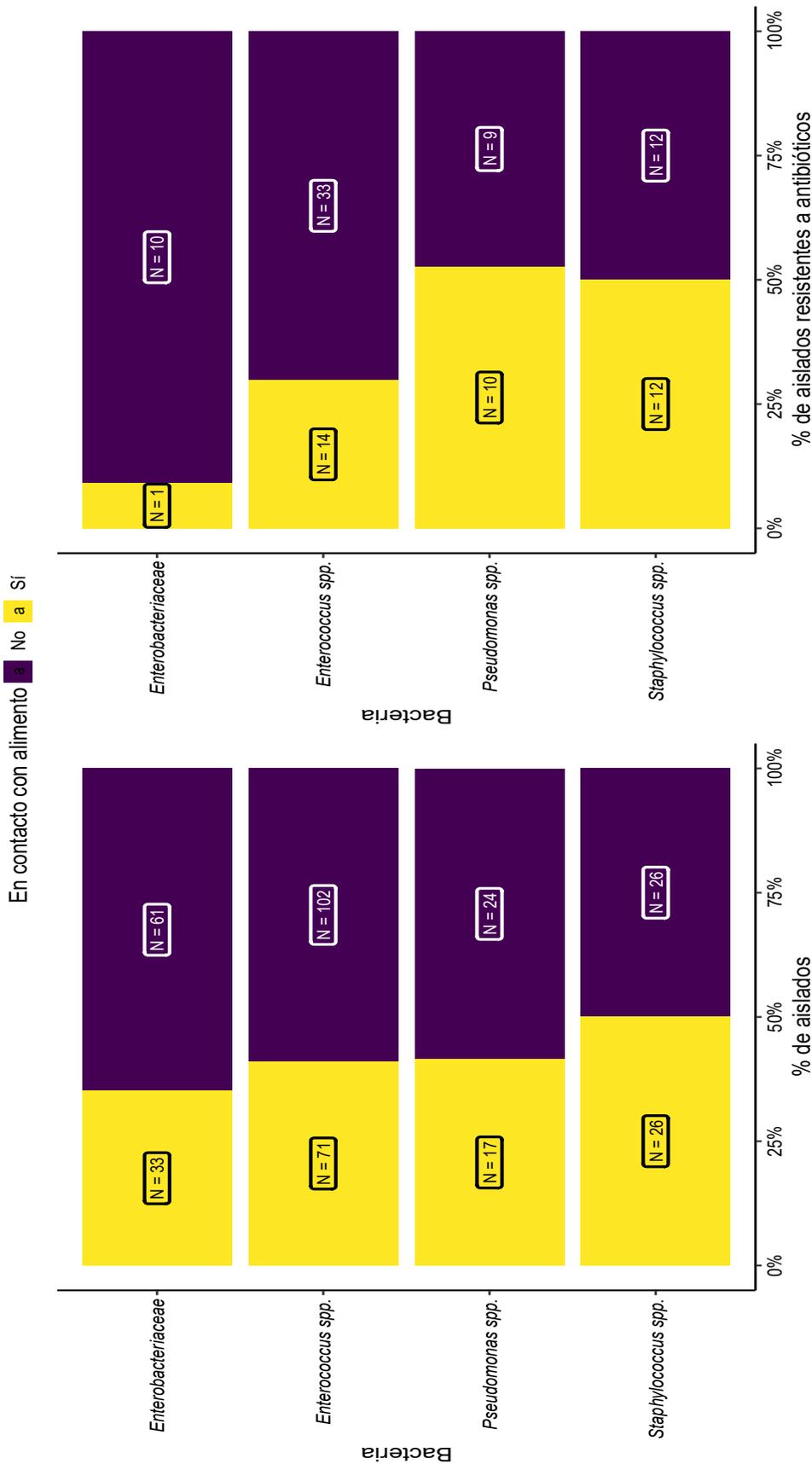


Figura 2 de la discusión general: Aislados recuperados de las superficies industriales.

A la izquierda se muestra el reparto porcentual de distintos aislados bacterianos entre las superficies de contacto (amarillo) y de no contacto (morado) con el alimento. Los números absolutos aparecen dentro de cada categoría. A la derecha se reproduce el mismo reparto porcentual, pero incluyendo únicamente los aislados bacterianos que mostraron resistencia fenotípica, creciendo en medios selectivos suplementados con distintos antibióticos (Enterobacteriaceae en medio ChromAgar ESBL, Enterococcus en medio ChromAgar VRE, Pseudomonas en medio ChromAgar mSuperCarba, Staphylococcus en medio ChromAgar MRSA).

En cuanto a los resultados de los análisis metagenómicos, a nivel taxonómico la α -diversidad y β -diversidad aumentaron progresivamente desde las primeras semanas de

Discusión general

muestreo, incluso antes de que comenzasen las actividades de faenado (T1), hasta las últimas fases del muestreo, en las que la microbiota ya se ha estabilizado (T3) (capítulo IV, Figura 2A). A corto plazo, tras la entrada de la materia prima y el inicio de las actividades de faenado (T2), se produjo un estado transitorio en la microbiota (capítulo IV, Figura 2C; capítulo IV, Figura 7D) tras el cual el número de contigs compartidos entre distintas muestras (contigs pertenecientes a la misma especie bacteriana) se reduce como consecuencia de que las bacterias que dominaban en el estadio inicial fueron desplazadas por nuevas especies más especializadas y adaptadas a distintos nichos ecológicos dentro de la industria. Estos cambios en el microbioma por la incorporación de materias primas o ingredientes tienen gran relevancia y se han descrito anteriormente en otros ámbitos, como el del microbioma intestinal. Así, al igual que la entrada de materia prima desplazó el microbioma industrial entre T1 y T3, Jarvis y colaboradores describieron cambios en el microbioma intestinal de ratones (Jarvis *et al.*, 2018) a raíz de alimentarlos con distintas dietas (alimentos cocinados y sin cocinar). A nivel de resistoma sucedieron cambios similares a los taxonómicos (capítulo IV, Figura 3A), con un incremento temporal en la α -diversidad y β -diversidad, en la abundancia de genes de resistencia y en el porcentaje de contigs asociados a plásmidos, replicando las observaciones realizadas por Zhu *et al.* (2013), que correlacionaron la abundancia de genes de resistencia a antimicrobianos y elementos móviles. La importancia de los elementos genéticos móviles en el resistoma de los ambientes de procesado de alimentos se explora también en el capítulo V, discutiéndose más adelante.

Los tres principales géneros bacterianos representados en la microbiota de los ambientes de procesado fueron *Pseudomonas* (57%), *Acinetobacter* (7%) y *Psychrobacter* (6%). *Pseudomonas* se ha identificado como un género dominante en la industria cárnica (Møretrø and Langsrud, 2017b), más ligado a la alteración y degradación del alimento que a brotes alimentarios. La importancia relativa de estos géneros fue similar en los microbiomas de varios mataderos e industrias cárnicas analizadas en el capítulo V, como se verá más adelante.

La presencia de *Pseudomonas* puede facilitar la persistencia de algunas cepas de *L. monocytogenes*, estudiada en el capítulo anterior, ya que algunas cepas de *Pseudomonas* son capaces de establecer sinergias y formar biofilms mixtos con *L. monocytogenes* (Møretrø and Langsrud, 2017b). El número de lecturas asignadas al género *Acinetobacter* se vio incrementado de forma abrupta en superficies de contacto con los alimentos, como equipos y mesas de corte (capítulo IV, Figura S5C), una vez que la microbiota se estableció en la industria (T3). *Acinetobacter* es un género al que pertenecen microorganismos frecuentemente encontrados en ambientes de procesado y alimentos relacionados con el sector cárnico (Ghaffoori Kanaan *et al.*, 2020). Entre sus especies, *Acinetobacter baumannii*, que se incluye en la lista de microorganismos de importancia clínica con multiresistencia a

Discusión general

antibióticos, ESKAPE, resulta especialmente preocupante (WHO, 2017a) por las infecciones nosocomiales que produce (Kröger *et al.*, 2017). Otros géneros bacterianos como *Psychrobacter* vieron aumentada su abundancia relativa en todas las superficies, mientras que *Acidovorax* y *Brevundimonas* se aclimataron mejor en los desagües.

El análisis de la información espacio-temporal de abundancia y categorización de genes de resistencia a antimicrobianos vinculados a los distintos géneros bacterianos, así como de elementos móviles a los que se asociaban, permitió **la consecución del cuarto objetivo de la Tesis Doctoral**. Los principales determinantes de resistencia a antibióticos detectados en las superficies se relacionaban con la resistencia frente a antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas (capítulo IV, Figura 3D). El incremento abrupto en la abundancia de genes de resistencia observado en equipos y mesas de corte en las últimas visitas de muestreo (T3) parece deberse, en parte, a la mayor abundancia de *Acinetobacter* en estas superficies (capítulo IV, Figura 4). Se detectaron correlaciones positivas entre determinantes de resistencia a las distintas familias de antibióticos previamente mencionadas y a las sulfonamidas (capítulo IV, Figura 5A). Estas familias de antibióticos son comúnmente empleadas por el sector porcino con fines terapéuticos (Lekagul *et al.*, 2019), lo que indica que la materia prima (canales de cerdo) fue la principal fuente de entrada de microorganismos resistentes a la industria (González-Gutiérrez *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta que los muestreos se realizaron siempre tras las labores de limpieza y desinfección, y que la carne es un reservorio de estos microorganismos y genes de resistencia, sería necesario realizar nuevos estudios para dilucidar si el alto nivel de genes detectados se encuentra en bacterias vivas, o más posiblemente como restos de material genético tras la lisis de estas bacterias por los procesos de limpieza y desinfección (Cocolin *et al.*, 2018).

Más allá de los niveles de AMR detectados en superficies en contacto con alimento, como los equipos y mesas de cortes, en los que se obtuvieron recuentos de genes de resistencia por encima de la media, los desagües fueron otro nicho relevante en cuanto a la dispersión de AMR. De hecho, los desagües ya habían sido identificados previamente como nichos de AMR (Blom, 2015). Estas observaciones se han visto corroboradas en este estudio, en la que los desagües acumularon la mayor diversidad taxonómica (capítulo IV, Figura S2A), mayor diversidad de genes de resistencia (capítulo IV, Figura S6A y S6B) y mayor porcentaje de integrones por contig (capítulo IV, Figura 5C).

4.7. Estudio del microbioma y resistoma de distintas industrias alimentarias de los sectores cárnico y lácteo

En el capítulo V de la Tesis Doctoral, que formó la base de un artículo que se prevé será enviado en los próximos meses para su publicación a una revista de prestigio en el área de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, se abordó el quinto objetivo específico propuesto para esta Tesis:

“Caracterizar la microbiota y el resistoma de los ambientes de procesado de alimentos de 25 industrias alimentarias de los sectores cárnico y lácteo, identificando los microorganismos más problemáticos, el tipo de resistencias a antimicrobianos que portan, así como si estas resistencias son transmisibles horizontalmente en caso de estar localizadas en elementos genéticos móviles”

Se trata de un estudio que complementa los conocimientos generados en el capítulo IV (centrado en una única industria cárnica), ya que analiza la relación entre las comunidades bacterianas que colonizan los ambientes de procesado alimentario y el resistoma en 25 empresas de 3 tipos distintos (3 mataderos, 10 industrias de procesado de carne y productos cárnicos, y 12 industrias de procesado de leche y productos lácteos), la mayoría de ellas localizadas en la provincia de León.

El mantenimiento de niveles adecuados de seguridad alimentaria se consigue, en parte, mediante el control microbiológico de alimentos y ambientes de procesado de alimentos siguiendo protocolos estandarizados internacionales redactados por organizaciones como la *International Organization for Standardization (ISO, 2021a)* o el *European Committee for Standardization (CEN)*. La norma ISO 17025 establece buenas prácticas y un control de calidad que aseguran los resultados obtenidos por laboratorios acreditados (ENAC, 2021; ISO/IEC, 2021). Las normas ISO relacionadas con “microbiología” y “comida” son actualmente 88. Cabe destacar también la importancia de la norma ISO 16140 (ISO, 2021b), que ofrece a los laboratorios una forma estandarizada y regulada de validar protocolos alternativos de análisis frente a los denominados “métodos de referencia” aceptados a nivel mundial. La aplicación de esta última norma permitiría la utilización rutinaria y fiable de métodos de análisis más económicos, rápidos y automatizables que los métodos de referencia (Food Safety Magazine, 2016).

Como se describe con más detalle en la introducción de esta Tesis Doctoral, el desarrollo vertiginoso de nuevas tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, como los análisis de genoma completo o de metagenómica total, aplicados en esta Tesis Doctoral, y su abaratamiento gracias a los avances tecnológicos, ha fomentado su creciente implantación

Discusión general

en actividades de control microbiológico en la industria alimentaria, que se está apresurando en usar la última tecnología liberada al mercado (Mason *et al.*, 2017). Esta prisa por adoptar nuevas tecnologías que pueden quedar obsoletas al cabo de pocos años dificulta a éstos nuevos métodos llegar a un estado de madurez similar al alcanzado por los métodos de análisis microbiológico de referencia, para los que se dispone de protocolos estandarizados. El continuo desarrollo y mejora de tecnologías de secuenciación y *pipelines* de análisis bioinformático dificulta la estandarización de protocolos de trabajo (Tourlousse *et al.*, 2021) o el desarrollo de materiales/patrones de referencia que permitan comparar la efectividad de nuevos métodos en igualdad de condiciones (Phillips and Emteborg, 2016). En el año anterior a la redacción de esta Tesis Doctoral, el *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) ha trabajado en la elaboración de 2 materiales de referencia para el análisis del microbioma y en la selección de 4 métricas para evaluar la adecuación de distintos protocolos bioinformáticos (Amos *et al.*, 2020).

En el último informe de EFSA sobre enfermedades zoonóticas (EFSA, 2021) ya se hace referencia a como el tipado mediante análisis de genoma completo está siendo implantado en los planes de monitorización de seguridad alimentaria de distintos estados miembro de la Unión Europea. En dicho informe también se hace mención a que más de la mitad de los países tienen capacidad para emplear este tipo de tecnologías para mejorar la seguridad de la cadena alimentaria (BIOHAZ EFSA panel, 2020). El empleo de las técnicas de secuenciación para la detección de genes de resistencia a antimicrobianos en la cadena alimentaria comienza a ser una realidad, como muestran los últimos informes sobre la monitorización de la AMR en la cadena alimentaria (ECDC and EFSA, 2021b). Hace tan sólo 4 años el comité de EUCAST emitió un informe en el que no encontraba evidencias lo suficientemente sólidas para recomendar el uso del análisis de genoma completo para la determinación de la susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos (Ellington *et al.*, 2017), pero la WHO considera cuestión de tiempo que estas tecnologías sustituyan o complementen a las actuales técnicas fenotípicas en la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos y detección de AMR en patógenos alimentarios (WHO, 2018). De hecho, la aplicación de análisis genómicos y metagenómicos en la monitorización de AMR comienza a ser analizada en informes de la EFSA (BIOHAZ EFSA panel, 2019), lo cual es el primer paso para su implementación en actividades de control microbiológicos para la mejora de la seguridad alimentaria.

En el capítulo V se muestrearon 250 superficies en contacto con alimentos y 250 superficies que no entran en contacto directo con el alimento. Las superficies muestreadas provenían de 25 industrias alimentarias, y se agruparon en 50 muestras compuestas (dos muestras por empresa). De estas 50 muestras, para 3 de ellas no fue posible extraer suficiente

Discusión general

cantidad de ADN, y dos más fueron descartadas por un alto porcentaje de duplicación en sus lecturas. Existen múltiples métodos de extracción de ADN, estos métodos tienen asociados unos sesgos en función de las especies bacterianas presentes en la comunidad. Las muestras con baja carga microbiana, como las provenientes de los ambientes de procesado de alimentos, son especialmente problemáticas (Sui *et al.*, 2020). Si bien se ha demostrado que el empleo de réplicas en la secuenciación ayuda en la diferenciación taxonómica del microbioma (Lanzén *et al.*, 2017), el amplio rango de empresas y tipos de superficies analizadas impuso restricciones económicas que han impedido el empleo de réplicas de secuenciación.

El análisis taxonómico de las bacterias presentes en la microbiota de las industrias alimentarias mostró una mayor riqueza y diversidad de géneros bacterianos en los mataderos respecto a las otras empresas muestreadas. Esto puede deberse a la contaminación con bacterias intestinales a causa de la evisceración (Song *et al.*, 2021) o a que en los mataderos no se apliquen con igual intensidad que en las plantas de procesado los diversos procesos de desinfección de superficies que pueden seleccionar a especies bacterianas concretas adaptadas a las condiciones de estrés impuestas (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2015). La menor limpieza y desinfección de las superficies rebajaría la presión selectiva del ambiente y, en los resultados preliminares de este trabajo, se observaron comunidades bacterianas más diversas en superficies que no estaban en contacto con el alimento. Por el contrario, las superficies en contacto con alimentos mostraron menor diversidad de géneros bacterianos y mayor dominancia de unos pocos géneros. Al mismo tiempo que determinados géneros bacterianos se especializan y dominan en el microbioma, las comunidades bacterianas pertenecientes a superficies de contacto fueron más distintas entre sí que las obtenidas de superficies en no contacto con el alimento, indicando el peso que tiene la microbiota introducida en la industria con la materia prima en la microbiota de los ambientes de procesado (de Souza Sant, 2017). La gran influencia de la microbiota de la materia prima en la microbiota industrial sería un fenómeno análogo a la importancia que tiene la microbiota de la piel humana en el establecimiento de la microbiota en ambientes hospitalarios (Lax *et al.*, 2017; Klassert *et al.*, 2021). En las superficies en contacto con alimento de las industrias cárnicas predominó el género *Pseudomonas*, en mataderos el género *Psychrobacter*, mientras que en industrias lácteas el género predominante fue *Lactococcus*.

En cuanto a la diversidad del resistoma, el mayor número de genes de resistencia diferentes se encontró en los mataderos, lugares de la cadena alimentaria más cercanos a las granjas y ambientes de producción animal, donde también se han descrito una gran abundancia y diversidad de genes de resistencia tanto en los animales como en los ambientes asociados (Mencía-Ares *et al.*, 2021). De manera análoga a lo observado a nivel taxonómico,

Discusión general

los distintos genes de resistencia detectados en superficies de contacto con alimentos fueron menos diversos y abundantes que los detectados en superficies de no contacto, pero tuvieron una mayor dominancia. Además, los resistomas de las superficies en contacto con alimento de las distintas industrias alimentarias fueron más distintos entre sí. Las principales resistencias a antimicrobianos detectadas fueron frente a dos tipos de antibióticos de uso veterinario, aminoglicósidos y tetraciclinas, y compuestos de amonio cuaternario (empleados como biocidas). De los 613 genes asociados a AMR detectados (Figura 3 de la discusión general), 142 estuvieron presentes en al menos una muestra relacionada con superficies de contacto, pero no se encontraron en superficies de no contacto con el alimento (Figura 2 de la discusión general). Esta exclusividad a la hora de detectar determinados genes de resistencia únicamente en muestras en contacto con el alimento es una manifestación de la especialización del resistoma en esas superficies, posiblemente propiciada por fenómenos de co-selección o resistencia cruzada, junto a genes de tolerancia a estrés (Giacometti *et al.*, 2021).

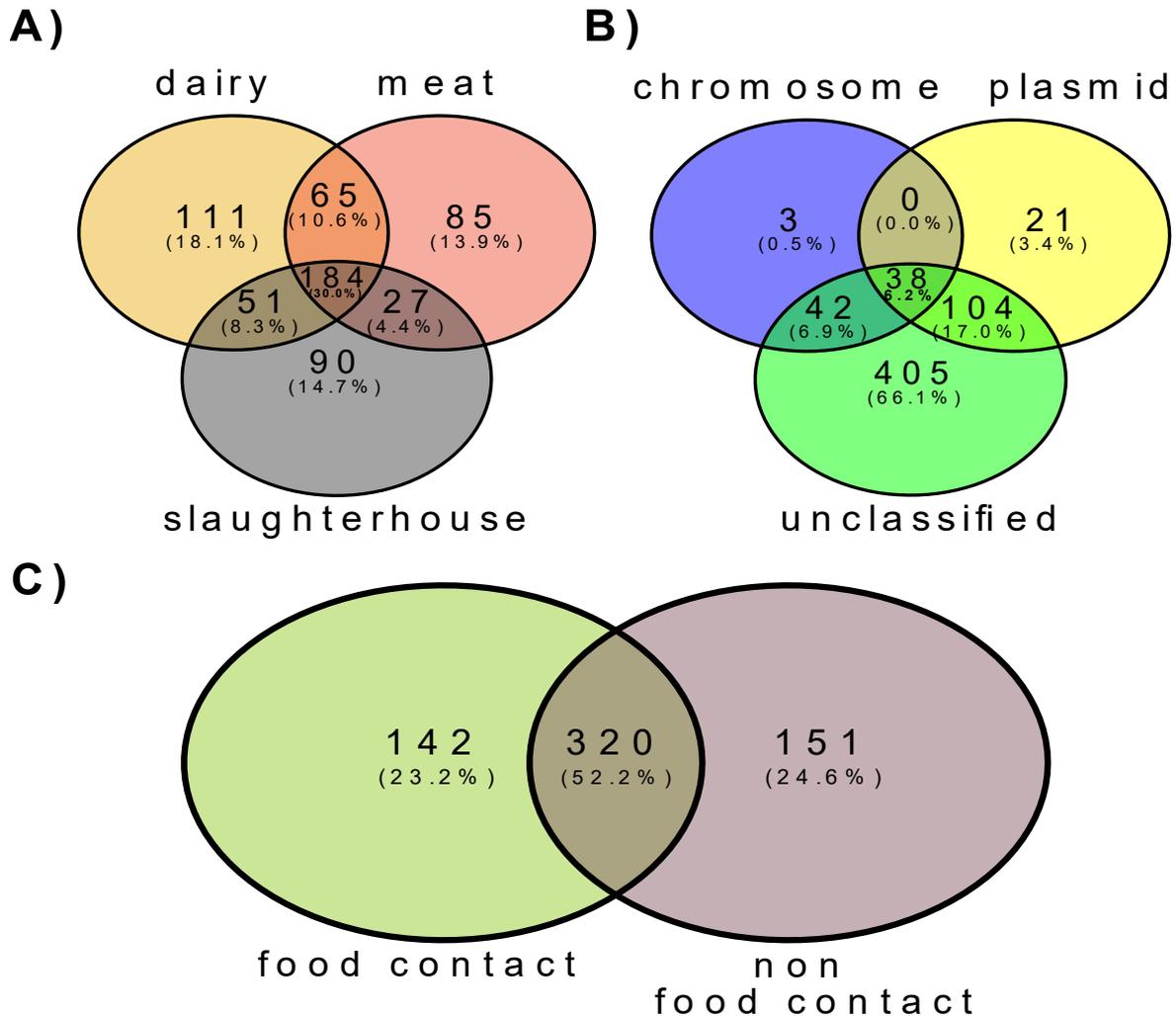


Figura 3 de la discusión general: Diagramas de Venn de los distintos genes de resistencia detectados. Agrupación de los distintos genes de resistencia en función del tipo de industria (A), el tipo de contig donde se localizan (B), o el tipo de superficie (C).

Como se observa en la Figura 6 del capítulo V, y se menciona en el informe del panel BIOHAZ sobre el empleo de la genómica y metagenómica para el análisis de riesgos en la cadena alimentaria (BIOHAZ EFSA panel, 2019), la asignación taxonómica de las lecturas asociadas a genes de resistencia a antimicrobianos no es posible en muchos casos. Aun así, se observaron ciertas relaciones entre determinados géneros bacterianos y resistencias a antibióticos y biocidas. En algunos grupos de muestras, se asoció de media un 20% de lecturas ligadas a resistencias frente a aminoglucósidos al género *Escherichia*, mientras que, de media, más del 50% de las lecturas relacionadas con resistencia frente a compuestos de amonio cuaternario se asignaron al género *Staphylococcus*, un género para el que se ha estudiado previamente la resistencia a este tipo de agentes biocidas (Wassenaar *et al.*, 2016; El Sayed Zaki *et al.*, 2019). En un futuro próximo, la dificultad en la asociación taxonómica de los genes de resistencia que afecta a las técnicas secuenciación de lecturas cortas, como las obtenidas usando las plataformas de Illumina, podría llegar a paliarse con la introducción de secuenciadores de lecturas largas (Nygaard *et al.*, 2020) en los estudios metagenómicos. A

Discusión general

su vez, la mejora en la resolución taxonómica de lecturas largas a nivel de género y especie podría ayudar a la detección y caracterización de cepas persistentes, cuya importancia se ha descrito en el capítulo III.

El uso de técnicas de secuenciación de lecturas largas en la monitorización ambiental de la AMR tendría también beneficios a la hora de detectar elementos genéticos móviles (Molina-Mora *et al.*, 2020), de gran importancia en la dispersión horizontal de estas resistencias a través de la cadena alimentaria. En los resultados obtenidos en el capítulo V empleando lecturas cortas, la proporción de contigs en los que se detectaron integrones o eventos de transferencia horizontal fue realmente baja (< 0.4% de los contigs). Estos elementos móviles suelen tener secuencias de inserción caracterizadas por regiones altamente repetitivas que dificultan el ensamblaje de las lecturas en contigs, haciendo que los extremos de los contigs se produzcan en ellas, lo que impide obtener su secuencia completa y dificulta su detección mediante herramientas basadas en alineamiento de secuencias. Dentro de los elementos genéticos móviles, los plásmidos son el principal vehículo para la dispersión de genes de AMR (Ricker *et al.*, 2021). En los resultados preliminares obtenidos se encontró una gran similitud en las copias por millón de lecturas asociadas a AMR entre todo el resistoma y el resistoma asignado a contigs plasmídicos. Esta similitud muestra la relevancia del plasmidoma en la transmisión de AMR y ha sido también descrita en otros estudios que analizaron AMR en muestras ambientales (Kirstahler *et al.*, 2021).

En resumen, en el capítulo V se han podido identificar los principales géneros bacterianos y resistencias a antimicrobianas mayoritarias presentes en ambientes de procesado de alimentos de industrias de los sectores cárnico y lácteo, habiéndose conseguido asignar una buena parte de los genes de resistencia encontrados a géneros concretos. Parte de estos genes de resistencia se localizaron en contigs clasificados como plásmidos, característica que indica la capacidad de estos genes para ser transmitidos horizontalmente. A la luz de las observaciones extraídas, se considera que **se ha alcanzado el quinto objetivo de la Tesis Doctoral.**

Con la consecución de los cinco objetivos específicos de esta Tesis Doctoral se ha demostrado el interés que tiene la incorporación de las técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos (análisis de genoma completo y análisis metagenómico total) en el control de microorganismos patógenos y resistencias a antimicrobianos en la cadena alimentaria. La aplicación de estas técnicas permitirá en un futuro obtener multitud de datos cuantitativos sobre abundancias de microorganismos, elementos móviles y genes de resistencia, que podrán ser incorporados en esquemas de análisis de riesgo (Berendonk *et al.*, 2015), pudiendo predecir y/o prevenir el riesgo de contaminación del producto final y su repercusión

Discusión general

para el consumidor (Beans, 2017), así como evaluar la eficacia de nuevas estrategias de higiene y desinfección en el mantenimiento de una microbiota industrial que promueva la inocuidad alimentaria. A pesar de las barreras que hay que superar para su implantación, las múltiples posibilidades que ofrecen las técnicas genómicas y metagenómicas han sido resumidas por el panel BIOHAZ de EFSA (BIOHAZ EFSA panel, 2019), comenzándose a atisbar iniciativas para la incorporación y estandarización de estas técnicas en la vigilancia de la cadena alimentaria (Llarena *et al.*, 2018).

5. Conclusiones

Conclusiones

En base a los objetivos planteados para esta Tesis Doctoral, los resultados obtenidos referentes a la influencia que tienen sobre bacterias patógenas de transmisión alimentaria la exposición a condiciones de estrés en la aparición y diseminación de resistencias a antimicrobianos en la cadena alimentaria, así como sobre la caracterización del microbioma y resistoma de los ambientes de procesado de alimentos en industrias de los sectores cárnico y lácteo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1)** El plasma atmosférico no térmico y la luz ultravioleta pueden ejercer presiones selectivas que favorezcan el desarrollo de resistencias a antibióticos de interés clínico. Este fenómeno se limitó a antibióticos cuya diana de actuación participa en la síntesis proteica o en la replicación del ADN. Los fenotipos resistentes desarrollados son debidos a mutaciones en los genes que codifican para las dianas celulares de actuación de dichos antibióticos o bien a alteraciones en algunos reguladores de respuesta a estrés y transportadores de membrana involucrados en la expulsión no selectiva de antimicrobianos. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de validar cuidadosamente la aplicación de estas tecnologías no térmicas y alternativas a biocidas para garantizar un nivel suficiente de inactivación bacteriana, con el fin de evitar la dispersión de bacterias resistentes a los antimicrobianos.
- 2)** Se ha diseñado un protocolo de conjugación plasmídica en medio líquido que permite estudiar, tanto en medio de laboratorio como en leche, el efecto que distintas condiciones ambientales estresantes y agentes químicos ejercen sobre la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos de espectro extendido. Mediante su uso se ha comprobado que algunos parámetros como la temperatura, el pH o la exposición a concentraciones residuales de compuestos biocidas influyen en las tasas de transferencia horizontal. La utilización de este protocolo permite identificar factores de riesgo asociados a la transferencia horizontal de genes de resistencia a antimicrobianos y diseñar estrategias dirigidas a su inhibición.
- 3)** La identificación, en un estudio longitudinal de año y medio en una industria cárnica recién construida, de varias cepas de *Listeria monocytogenes* con elevado porcentaje de similitud en sus genomas, confirma la capacidad de este microorganismo patógeno para colonizar y persistir en ambientes industriales de procesado de alimentos. El hecho de que estas cepas vehicularan plásmidos, prácticamente idénticos, portadores de genes de resistencia a biocidas, metales

Conclusiones

pesados y tolerancia a estrés, indica que la persistencia ambiental de determinados linajes de este microorganismo puede estar mediada por plásmidos.

- 4) El estudio mediante técnicas metagenómicas de las poblaciones microbianas que iban colonizando los ambientes de procesamiento de esta misma industria cárnica demostró la transición desde una microbiota generalista, dominada en los primeros meses de actividad por *Pseudomonas*, hacia diversas microbiotas especializadas, adaptadas a los distintos nichos industriales, en las que adquirirían especial relevancia otros grupos taxonómicos, como *Acinetobacter* y *Psychrobacter*.
- 5) El inicio de las actividades de faenado de la carne en esta industria cárnica fue el detonante de un incremento progresivo en la abundancia de genes de resistencia a antimicrobianos, lo que indica que las canales supusieron la principal fuente de entrada de bacterias resistentes a antimicrobianos. Estas bacterias resistentes pueden, posteriormente, colonizar los ambientes de procesamiento, convirtiéndolos en reservorios y fuentes de dispersión de resistencias a través de episodios de contaminación cruzada. El hecho de que *Acinetobacter* fuese identificado como el principal género portador de genes de resistencia resulta especialmente preocupante, ya que *Acinetobacter* apenas ha recibido atención en el ámbito alimentario, a pesar de pertenecer al grupo “ESKAPE” de patógenos con importancia clínica por su multiresistencia a antibióticos.
- 6) La elevada carga y diversidad de microorganismos, genes de resistencia a antimicrobianos y elementos genéticos móviles como plásmidos e integrones, que fueron detectados en los desagües de esta industria cárnica, revela que éstos son un reservorio de máxima importancia, por lo que su vigilancia y mantenimiento resultan prioritarios para controlar la dispersión de bacterias resistentes.
- 7) El análisis mediante estudios metagenómicos del microbioma perteneciente a ambientes de procesamiento de 25 industrias de los sectores cárnico y lácteo mostró:
 - (i) que los mataderos albergan una mayor riqueza de géneros bacterianos que las plantas de procesamiento de productos cárnicos y lácteos.
 - (ii) que las industrias lácteas, en especial las superficies de contacto con alimentos, tienen una composición taxonómica más heterogénea y más determinada en función de la planta de procesamiento.
 - (iii) que existen géneros bacterianos más frecuentemente asociados a industrias del sector cárnico, como *Pseudomonas* o *Psychrobacter*, o del sector lácteo, como las bacterias ácido lácticas *Lactococcus* o *Streptococcus*.

Conclusiones

- 8)** El estudio del resistoma de los ambientes de procesamiento de esas 25 industrias colaboradoras evidenció que, en comparación con las del sector lácteo, las industrias del sector cárnico y en especial los mataderos, presentan niveles más altos de genes de resistencia a aminoglucósidos, principalmente asociados al género *Escherichia*, y resistencias a tetraciclinas, mayormente vinculadas a los géneros *Bacillus* y *Megasphaera*. El hecho de que el 63% de las lecturas relacionadas con genes de resistencia estuviesen localizadas en contigs clasificados como plasmídicos, y que éstos presentaran una mayor diversidad de genes de resistencia a aminoglucósidos y tetraciclinas que los contigs cromosómicos, indica que el resistoma perteneciente a los ambientes de procesamiento de alimentos se encuentra fuertemente moldeado por elementos genéticos móviles y es, por tanto, susceptible de transmitirse horizontalmente.
- 9)** Determinados ambientes de contacto con alimentos de varias plantas de elaboración de productos cárnicos y lácteos mostraron una abundancia muy elevada de genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario, asociados principalmente al género *Staphylococcus*. Esto indica que los procesos de limpieza y desinfección aplicados no son del todo eficientes y pueden seleccionar una microbiota resistente a este tipo de agentes biocidas, que tiene capacidad de persistir en las industrias.
- 10)** Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de las nuevas tecnologías genómicas y metagenómicas en las actividades de monitorización y vigilancia de microorganismos patógenos, así como en la determinación de resistencias a antimicrobianos en la cadena alimentaria. La incorporación en esquemas de análisis cuantitativo de riesgo de la información obtenida mediante la utilización de estas tecnologías de nueva generación permitirá reducir la incertidumbre asociada a dichos análisis, contribuyendo a un mejor aseguramiento de la inocuidad alimentaria.

Conclusiones

6. Bibliografía

Bibliografía

Aalto-Araneda, M., Lundén, J., Markkula, A., Hakola, S. and Korkeala, H. (2019) "Processing plant and machinery sanitation and hygiene practices associate with *Listeria monocytogenes* occurrence in ready-to-eat fish products", *Food Microbiology*. Academic Press, 82, pp. 455–464. doi:10.1016/j.fm.2019.03.017.

Alderliesten, J. B., Duxbury, S. J. N., Zwart, M. P., De Visser, J. A. G. M., Stegeman, A. and Fischer, E. A. J. (2020) "Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: A meta-analysis", *BMC Microbiology*. BioMed Central Ltd., 20(125), p. 125. doi:10.1186/s12866-020-01825-4.

Álvarez-Molina, A., de Toro, M., Alexa, E. A. and Álvarez-Ordóñez, A. (2020) "Applying Genomics to Track Antimicrobial Resistance in the Food Chain", *Reference Module in Food Science*. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.22700-5.

Álvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C. and Prieto, M. (2015) "The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety", *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 213, pp. 99–109. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004.

Amos, G. C. A., Logan, A., Anwar, S., Fritzsche, M., Mate, R., Bleazard, T. and Rijpkema, S. (2020) "Developing standards for the microbiome field", *Microbiome 2020 8:1*. BioMed Central, 8(1), pp. 1–13. doi:10.1186/S40168-020-00856-3.

Andersson, D. I. and Hughes, D. (2014) "Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics", *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 12(7), pp. 465–478. doi:10.1038/nrmicro3270.

Baharoglu, Z., Bikard, D. and Mazel, D. (2010) "Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation", *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 6(10), pp. 1–10. doi:10.1371/journal.pgen.1001165.

Beans, C. (2017) "Companies seek food safety using a microbiome approach", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(51), pp. 13306–13308. doi:10.1073/pnas.1719373114.

Bengtsson-Palme, J. (2017) "Antibiotic resistance in the food supply chain: where can sequencing and metagenomics aid risk assessment?", *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd, 14, pp. 66–71. doi:10.1016/j.cofs.2017.01.010.

Bibliografía

Bennani, H., Mateus, A., Mays, N., Eastmure, E., Stärk, K. D. C. and Häslar, B. (2020) "Overview of evidence of antimicrobial use and antimicrobial resistance in the food chain", *Antibiotics*, 9(2), pp. 1–18. doi:10.3390/antibiotics9020049.

Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F. and Martinez, J. L. (2015) "Tackling antibiotic resistance: The environmental framework", *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 310–317. doi:10.1038/nrmicro3439.

Bialek-Davenet, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Lavigne, J. P., Bert, F., Moreau, R. and Nicolas-Chanoine, M. H. (2011) "In vitro selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 55(6), pp. 2795–2802. doi:10.1128/AAC.00156-11.

BIOHAZ EFSA panel (2018) "*Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU", *EFSA Journal*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 16(1). doi:10.2903/j.efsa.2018.5134.

BIOHAZ EFSA panel (2019) "Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms", *EFSA Journal*, 17(12). doi:10.2903/j.efsa.2019.5898.

BIOHAZ EFSA panel (2020) "Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC", *EFSA Journal*, 18(1), pp. 1–105. doi:10.2903/j.efsa.2020.5967.

BIOHAZ EFSA panel (2021) "Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain", *EFSA Journal*. Wiley-Blackwell, 19(6), pp. 11–14. doi:10.2903/J.EFSA.2021.6651.

Blom, K. (2015) "Drainage systems, an occluded source of sanitation related outbreaks", *Archives of Public Health*. BioMed Central Ltd., 73(1), pp. 1–8. doi:10.1186/s13690-014-0056-6.

Braoudaki, M. and Hilton, A. C. (2004) "Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157", *FEMS Microbiology Letters*. FEMS Microbiol Lett, 235(2), pp. 305–309. doi:10.1016/j.femsle.2004.04.049.

Bibliografía

Brown, D. F. J., Wootton, M. and Howe, R. A. (2016) "Antimicrobial susceptibility testing breakpoints and methods from BSAC to EUCAST", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), pp. 3–5. doi:10.1093/jac/dkv287.

Cabral, D. J., Wurster, J. I. and Belenky, P. (2018) "Antibiotic persistence as a metabolic adaptation: Stress, metabolism, the host, and new directions", *Pharmaceuticals*. MDPI AG. doi:10.3390/ph11010014.

Calvo, T., Prieto, M., Álvarez-Ordóñez, A. and López, M. (2020) "Effect of Non-Thermal Atmospheric Plasma on Food-Borne Bacterial Pathogens on Ready-to Eat Foods: Morphological and Physico-Chemical Changes Occurring on the Cellular Envelopes", *Foods*. MDPI AG, 9(12), p. 1865. doi:10.3390/foods9121865.

Campos Calero, G., Caballero Gómez, N., Benomar, N., Pérez Montoro, B., Knapp, C. W., Gálvez, A. and Abriouel, H. (2018) "Deciphering Resistome and Virulome Diversity in a Porcine Slaughterhouse and Pork Products Through Its Production Chain", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 9(SEP), p. 2099. doi:10.3389/fmicb.2018.02099.

Capita, R. and Alonso-Calleja, C. (2013) "Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), pp. 11–48. doi:10.1080/10408398.2010.519837.

Carr, V. R., Shkoporov, A., Hill, C., Mullany, P. and Moyes, D. L. (2021) "Probing the Mobilome: Discoveries in the Dynamic Microbiome", *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 158–170. doi:10.1016/j.tim.2020.05.003.

Cen, T., Zhang, X., Xie, S. and Li, D. (2020) "Preservatives accelerate the horizontal transfer of plasmid-mediated antimicrobial resistance genes via differential mechanisms", *Environment International*. Elsevier Ltd, 138, p. 105544. doi:10.1016/j.envint.2020.105544.

Chen, Z. (2017) "Stress Responses of Foodborne Pathogens and Implications in Food Safety", *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*. OMICS Publishing Group, 02(02). doi:10.4172/2476-2059.1000e103.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2021) *Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines*. Available at: <https://clsi.org/> (Accessed: 9 February 2021).

Cocolin, L., Mataragas, M., Bourdichon, F., Doulgeraki, A., Pilet, M. F., Jagadeesan, B., Rantsiou, K. and Phister, T. (2018) "Next generation microbiological risk assessment meta-omics: The next need for integration", *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 287, pp. 10–17. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.008.

Bibliografía

Cohen, N. R., Lobritz, M. A. and Collins, J. J. (2013) "Microbial persistence and the road to drug resistance", *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 13(6), pp. 632–642. doi:10.1016/j.chom.2013.05.009.

Commission of the European Communities (2000) "Commission Decision 2000/96/EC of 22 December 1999 on the communicable diseases to be progressively covered by the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council", *Official Journal of the European Union*, 3(4), pp. 1998–2001. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:028:0050:0053:EN:PDF>.

Curiao, T., Marchi, E., Grandgirard, D., León-Sampedro, R., Viti, C., Leib, S. L., Baquero, F., Oggioni, M. R., Martinez, J. L. and Coque, T. M. (2016) "Multiple adaptive routes of *Salmonella enterica* Typhimurium to biocide and antibiotic exposure", *BMC Genomics*. BioMed Central, 17(1), p. 491. doi:10.1186/s12864-016-2778-z.

Cusack, T. P., Ashley, E. A., Ling, C. L., Roberts, T., Turner, P., Wangrangsimakul, T. and Dance, D. A. B. (2019) "Time to switch from CLSI to EUCAST? A Southeast Asian perspective". doi:10.1016/j.cmi.2019.03.007.

Dalkilic, S. S., Cheng, S., Avasthi, A. and Chi, S. (2020) "Resistance to sucralose in *Escherichia coli* is not conferred by mutations in the quinolone resistance determining regions of *gyrA*", 25(September), pp. 1–10.

Defraigne, V., Fauvart, M. and Michiels, J. (2018) "Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics". doi:10.1016/j.drug.2018.03.002.

Deng, L. Z., Mujumdar, A. S., Pan, Z., Vidyarthi, S. K., Xu, J., Zielinska, M. and Xiao, H. W. (2020) "Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: a comprehensive review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc., pp. 2481–2508. doi:10.1080/10408398.2019.1649633.

ECDC (2020) "Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual Epidemiological Report 2019.", (November), pp. 1–25.

ECDC (2021a) *About ECDC, About us*. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-ecdc> (Accessed: 8 February 2021).

ECDC (2021b) *About the The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), ECDC*. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-networks-and-laboratory-networks/ears-net-about> (Accessed: 8 February 2021).

Bibliografía

ECDC (2021c) *Antimicrobial consumption database (ESAC-Net)*. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database> (Accessed: 8 February 2021).

ECDC (2021d) *Surveillance Atlas of Infectious Diseases*. Available at: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4> (Accessed: 8 February 2021).

ECDC (2021e) *The European Surveillance System (TESSy)*, Stockholm. Available at: [https://wiki.ecdc.europa.eu/fem/Pages/The European Surveillance System \(TESSy\).aspx](https://wiki.ecdc.europa.eu/fem/Pages/The_European_Surveillance_System_(TESSy).aspx) (Accessed: 8 February 2021).

ECDC and EFSA (2018) "The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016", *EFSA Journal*, 16(2). doi:10.2903/j.efsa.2018.5182.

ECDC and EFSA (2019) "The European Union One Health 2018 Zoonoses Report", *EFSA Journal*, 17(12). doi:10.2903/j.efsa.2019.5926.

ECDC and EFSA (2020) "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018", *EFSA Journal*, 18(3). doi:10.2903/j.efsa.2020.6007.

ECDC and EFSA (2021a) "The European Union One Health 2019 Zoonoses Report.", *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 19(2), p. e06406. doi:10.2903/j.efsa.2021.6406.

ECDC and EFSA (2021b) The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019, *EFSA Journal*. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.2903/J.EFSA.2021.6490.

ECDC, EFSA and EMA (2015) ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals, *EFSA Journal*. doi:10.2903/j.efsa.2015.4006.

ECDC, EFSA and EMA (2017) ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistan, *EFSA Journal*. doi:10.2903/j.efsa.2017.4872.

EFSA (2021) *The European Union One Health 2019 Zoonoses Report*, *EFSA Journal*. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.2903/j.efsa.2021.6406.

Bibliografía

EFSA and ECDC (2019) "EFSA and ECDC technical report on the collection and analysis of whole genome sequencing data from food-borne pathogens and other relevant microorganisms isolated from human, animal, food, feed and food/feed environmental samples in the joint ECDC-EFSA mission", *EFSA Supporting Publications*. Wiley, 16(5). doi:10.2903/sp.efsa.2019.en-1337.

Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., Grundman, H., Hasman, H., Holden, M. T. G., Hopkins, K. L., Iredell, J., Kahlmeter, G., Köser, C. U., MacGowan, A., Mevius, D., Mulvey, M., Naas, T., Peto, T., Rolain, J. M., Samuelsen and Woodford, N. (2017) "The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee", *Clinical Microbiology and Infection*, 23(1), pp. 2–22. doi:10.1016/j.cmi.2016.11.012.

ENAC, E. N. de A. (2021) "Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo", 10(1–2). Available at: <https://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30> (Accessed: 25 October 2021).

EU (2012) Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Official Journal of the European Union.

European Commission (2015) Final communication from the commission to the european parliament and the council. Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance. Available at: <http://ec.europa.eu/research> (Accessed: 15 February 2021).

European Commission (2019) "Overview report: Biocides", *Publications Office of the European Union*, pp. 1–28. doi:10.2772/55801.

European Parliament and Council of the European Union (2004) "REGULATION (EC) No 851/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL of 21 April 2004", *Official Journal of the European Communities*, 2004(1882), pp. 1–11. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0851&from=EN>.

FAO (2015) Thirty-ninth Session Rome, 6-13 June 2015 Status Report on Antimicrobial Resistance.

De Filippis, F., Valentino, V., Álvarez-Ordóñez, A., Cotter, P. D. and Ercolini, D. (2021) "Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality and safety in the food industry", *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd, pp. 168–176. doi:10.1016/j.cofs.2020.11.012.

Bibliografía

Florez-Cuadrado, D., Moreno, M. A., Ugarte-Ruíz, M. and Domínguez, L. (2018) "Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union", in *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press Inc., pp. 115–136. doi:10.1016/bs.afnr.2018.04.004.

Food Safety Magazine (2016) "ISO Revises Food Industry Standard for Microbiological Testing", *ISO Revises Food Industry Standard for Microbiological Testing*. Available at: <https://www.food-safety.com/articles/4842-iso-revises-food-industry-standard-for-microbiological-testing> (Accessed: 25 October 2021).

Forbes, J. D., Knox, N. C., Ronholm, J., Pagotto, F. and Reimer, A. (2017) "Metagenomics: The next culture-independent game changer", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., p. 1069. doi:10.3389/fmicb.2017.01069.

Founou, L. L., Founou, R. C. and Essack, S. Y. (2016) "Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective.", *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 7, p. 1881. doi:10.3389/fmicb.2016.01881.

Frost, L. S. and Koraimann, G. (2010) "Regulation of bacterial conjugation: Balancing opportunity with adversity", *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd., pp. 1057–1071. doi:10.2217/fmb.10.70.

Fu, Y., Zhang, W., Wang, H., Zhao, S., Chen, Y., Meng, F., Zhang, Y., Xu, H., Chen, X. and Zhang, F. (2013) "Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*", *BMC Infectious Diseases*. BioMed Central, 13(1), p. 8. doi:10.1186/1471-2334-13-8.

Garcia-Migura, L., Sanchez-Valenzuela, A. J. and Jensen, L. B. (2011) "Presence of Glycopeptide-Encoding Plasmids in Enterococcal Isolates from Food and Humans in Denmark", *Foodborne Pathogens and Disease*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 8(11), pp. 1191–1197. doi:10.1089/fpd.2011.0897.

Garrido-Cardenas, J. A., Garcia-Maroto, F., Álvarez-Bermejo, J. A. and Manzano-Agugliaro, F. (2017) "DNA sequencing sensors: An overview", *Sensors (Switzerland)*, 17(3), pp. 1–15. doi:10.3390/s17030588.

Garza-González, E., Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Ramírez-Fontes, A., Rodríguez-Zulueta, P., Flores-Treviño, S., Bocanegra-Ibarias, P., Maldonado-Garza, H. and Camacho-Ortiz, A. (2019) "Intestinal Microbiome Changes in Fecal Microbiota Transplant (FMT) vs. FMT Enriched with *Lactobacillus* in the Treatment of Recurrent *Clostridioides difficile* Infection", *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Hindawi Limited, 2019. doi:10.1155/2019/4549298.

Bibliografía

George, A. (2019) "Antimicrobial resistance (AMR) in the food chain: Trade, one health and codex", *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1). doi:10.3390/tropicalmed4010054.

Ghaffoori Kanaan, M. H., Al-Shadeedi, S. M. J., Al-Massody, A. J. and Ghasemian, A. (2020) "Drug resistance and virulence traits of *Acinetobacter baumannii* from Turkey and chicken raw meat", *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 70, p. 101451. doi:10.1016/j.cimid.2020.101451.

Giacometti, F., Shirzad-Aski, H. and Ferreira, S. (2021) "Antimicrobials and Food-Related Stresses as Selective Factors for Antibiotic Resistance along the Farm to Fork Continuum", *Antibiotics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 10(6). doi:10.3390/ANTIBIOTICS10060671.

Gião, M. S., Blanc, S., Porta, S., Belenguer, J. and Keevil, C. W. (2015) "Improved recovery of *Listeria monocytogenes* from stainless steel and polytetrafluoroethylene surfaces using air/water ablation", *Journal of Applied Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 119(1), pp. 253–262. doi:10.1111/jam.12837.

González-Gutiérrez, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. and Capita, R. (2020) "Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain", *Food Science & Nutrition*. Wiley-Blackwell, 8(2), pp. 777–785. doi:10.1002/fsn3.1319.

Goudarzi, M. (2019) "Overview Perspective of Bacterial Strategies of Resistance to Biocides and Antibiotics", 14(2). doi:10.5812/archcid.65744.Review.

Headd, B. and Bradford, S. A. (2018) "Physicochemical factors that favor conjugation of an antibiotic resistant plasmid in non-growing bacterial cultures in the absence and presence of antibiotics", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 9(SEP). doi:10.3389/fmicb.2018.02122.

Headd, B. and Bradford, S. A. (2020) "The Conjugation Window in an *Escherichia coli* K-12 Strain with an IncFII Plasmid", *Applied and Environmental Microbiology*, 86(17), pp. 1–18.

Hernandez-Beltran, J. C. R., Rodríguez-Beltrán, J., Millán, A. S., Peña-Miller, R. and Fuentes-Hernández, A. (2021) "Quantifying plasmid dynamics using single-cell microfluidics and image bioinformatics", *Plasmid*. Academic Press Inc., 113, p. 102517. doi:10.1016/j.plasmid.2020.102517.

Holch, A., Webb, K., Lukjancenko, O., Ussery, D., Rosenthal, B. M. and Gram, L. (2013) "Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart", *Applied*

Bibliografía

and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology (ASM), 79(9), pp. 2944–2951. doi:10.1128/AEM.03715-12.

Hudson, J. A., Frewer, L. J., Jones, G., Brereton, P. A., Whittingham, M. J. and Stewart, G. (2017) "The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review", *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 69(October), pp. 131–147. doi:10.1016/j.tifs.2017.09.007.

Hunter, P. R., Wilkinson, D. C., Catling, L. A., Barker, G. C., Al, H. E. T. and Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2008) "Meta-Analysis of Experimental Data Concerning Antimicrobial Resistance Gene Transfer Rates during Conjugation", 74(19), pp. 6085–6090. doi:10.1128/AEM.01036-08.

IACG (2019) *No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections*, *Artforum International*. Available at: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/>.

ISO/IEC (2021) *UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la compete...* Available at: <https://tienda.aenor.com/norma-une-en-iso-iec-17025-2017-n0059467> (Accessed: 25 October 2021).

ISO (2021a). Available at: <https://www.iso.org/home.html> (Accessed: 25 October 2021).

ISO (2021b) ISO - ISO 16140-3:2021 - Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Available at: <https://www.iso.org/standard/66324.html> (Accessed: 25 October 2021).

Jarvis, K. G., Daquigan, N., White, J. R., Morin, P. M., Howard, L. M., Manetas, J. E., Ottesen, A., Ramachandran, P. and Grim, C. J. (2018) "Microbiomes Associated With Foods From Plant and Animal Sources", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 9(OCT), p. 2540. doi:10.3389/fmicb.2018.02540.

Johnsen, A. R. and Kroer, N. (2007) "Effects of stress and other environmental factors on horizontal plasmid transfer assessed by direct quantification of discrete transfer events", *FEMS Microbiology Ecology*. Oxford Academic, 59(3), pp. 718–728. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00230.x.

Kahlmeter, G. (2015) "The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement?", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(9), pp. 2427–2439. doi:10.1093/jac/dkv145.

Bibliografía

Kanamori, H., Rutala, W. A., Gergen, M. F. and Weber, D. J. (2020) "Perioperative Bacterial Contamination From Patients on Contact Precaution in Operating Room Environment", *Open Forum Infectious Diseases*. Oxford Academic, 7(11). doi:10.1093/OFID/OFAA508.

Karatzas, K. A. G., Randall, L. P., Webber, M., Piddock, L. J. V., Humphrey, T. J., Woodward, M. J. and Coldham, N. G. (2008) "Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium selected following exposure to disinfectants", *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 74(5), pp. 1508–1516. doi:10.1128/AEM.01931-07.

Karatzas, K. A. G., Webber, M. A., Jorgensen, F., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V. and Humphrey, T. J. (2007) "Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. J Antimicrob Chemother, 60(5), pp. 947–955. doi:10.1093/jac/dkm314.

Kassim, A., Omuse, G., Premji, Z. and Revathi, G. (2016) "Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: A cross-sectional study", *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. BioMed Central, 15(1), pp. 1–7. doi:10.1186/s12941-016-0135-3.

Kirstahler, P., Teudt, F., Otani, S., Aarestrup, F. M. and Pamp, S. J. (2021) "A Peek into the Plasmidome of Global Sewage", *mSystems*. American Society for Microbiology, 6(3). doi:10.1128/MSYSTEMS.00283-21.

Klassert, T. E., Leistner, R., Zubiria-Barrera, C., Stock, M., López, M., Neubert, R., Driesch, D., Gastmeier, P. and Slevogt, H. (2021) "Bacterial colonization dynamics and antibiotic resistance gene dissemination in the hospital environment after first patient occupancy: a longitudinal metagenetic study", *Microbiome 2021 9:1*. BioMed Central, 9(1), pp. 1–17. doi:10.1186/S40168-021-01109-7.

Knapp, L., Amézquita, A., McClure, P., Stewart, S. and Maillard, J. Y. (2015) "Development of a protocol for predicting bacterial resistance to microbicides", *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), pp. 2652–2659. doi:10.1128/AEM.03843-14.

Kong, K. F., Schneper, L. and Mathee, K. (2010) "Beta-lactam antibiotics: From antibiotic resistance to resistance and bacteriology", *Apmis*, 118(1), pp. 1–36. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x.

Bibliografía

Kröger, C., Kary, S. C., Schauer, K. and Cameron, A. D. S. (2017) "Genetic regulation of virulence and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*", *Genes*. MDPI AG. doi:10.3390/genes8010012.

Kropac, A. C., Eshwar, A. K., Stephan, R. and Tasara, T. (2019) "New Insights on the Role of the pLMST6 Plasmid in *Listeria monocytogenes* Biocide Tolerance and Virulence", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 10(JULY), p. 1538. doi:10.3389/fmicb.2019.01538.

Kumar, S. B., Arnipalli, S. R. and Ziouzenkova, O. (2020) "Antibiotics in food chain: The consequences for antibiotic resistance", *Antibiotics*, 9(10), pp. 1–26. doi:10.3390/antibiotics9100688.

Lake, I., Colón-González, F., Takkinen, J., Rossi, M., Sudre, B., Dias, J. G., Tavošchi, L., Joshi, A., Semenza, J. and Nichols, G. (2019) "Exploring *Campylobacter* seasonality across Europe using The European Surveillance System (TESSy), 2008 to 2016", *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 24(13), p. 1800028. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.180028.

Lanzén, A., Lekang, K., Jonassen, I., Thompson, E. M. and Troedsson, C. (2017) "DNA extraction replicates improve diversity and compositional dissimilarity in metabarcoding of eukaryotes in marine sediments", *PLOS ONE*. Public Library of Science, 12(6), p. e0179443. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0179443.

Larrosa, M. N., Benito, N., Cantón, R., Canut, A., Cercenado, E., Fernández-Cuenca, F., Guinea, J., López-Navas, A., Moreno, M. Á., Oliver, A. and Martínez-Martínez, L. (2020) "Del CLSI al EUCAST, una transición necesaria en los laboratorios españoles", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(2), pp. 79–83. doi:10.1016/j.eimc.2018.09.014.

Lax, S., Sangwan, N., Smith, D., Larsen, P., Handley, K. M., Richardson, M., Guyton, K., Krezalek, M., Shogan, B. D., Defazio, J., Flemming, I., Shakhsheer, B., Weber, S., Landon, E., Garcia-Houchins, S., Siegel, J., Alverdy, J., Knight, R., Stephens, B. and Gilbert, J. A. (2017) "Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital", *Science Translational Medicine*. Sci Transl Med, 9(391). doi:10.1126/scitranslmed.aah6500.

Lee, K. and Brumme, Z. L. (2013) "Operationalizing the One Health approach: The global governance challenges", *Health Policy and Planning*. Health Policy Plan, 28(7), pp. 778–785. doi:10.1093/heapol/czs127.

Lekagul, A., Tangcharoensathien, V. and Yeung, S. (2019) "Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review", *Veterinary and Animal Science*. Elsevier B.V., p. 100058. doi:10.1016/j.vas.2019.100058.

Bibliografía

Leonard, A., Möhlis, K., Schlüter, R., Taylor, E., Lalk, M. and Methling, K. (2020) "Exploring metabolic adaptation of *Streptococcus pneumoniae* to antibiotics", *Journal of Antibiotics*. Springer Nature, 73(7), pp. 441–454. doi:10.1038/s41429-020-0296-3.

Lerminiaux, N. A. and Cameron, A. D. S. (2019) "Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments", *Canadian Journal of Microbiology*. Canadian Science Publishing, 65(1), pp. 34–44. doi:10.1139/cjm-2018-0275.

Li, B., Qiu, Y., Song, Y., Lin, H. and Yin, H. (2019) "Dissecting horizontal and vertical gene transfer of antibiotic resistance plasmid in bacterial community using microfluidics", *Environment International*. Elsevier Ltd, 131, p. 105007. doi:10.1016/j.envint.2019.105007.

Llarena, A., Ribeiro-Gonçalves, B. F., Nuno Silva, D., Halkilahti, J., Machado, M. P., Da Silva, M. S., Jaakkonen, A., Isidro, J., Hämäläinen, C., Joenperä, J., Borges, V., Viera, L., Gomes, J. P., Correia, C., Lunden, J., Laukkanen-Ninios, R., Fredriksson-Ahomaa, M., Bikandi, J., Millan, R. S., Martinez-Ballesteros, I., Laorden, L., Mäesaar, M., Grantina-Ievina, L., Hilbert, F., Garaizar, J., Oleastro, M., Nevas, M., Salmenlinna, S., Hakkinen, M., Carriço, J. A. and Rossi, M. (2018) "INNUENDO: A cross-sectoral platform for the integration of genomics in the surveillance of food-borne pathogens", *EFSA Supporting Publications*. Wiley, 15(11). doi:10.2903/sp.efsa.2018.en-1498.

López, M., Calvo, T., Prieto, M., Múgica-Vidal, R., Muro-Fraguas, I., Alba-Elías, F. and Álvarez-Ordóñez, A. (2019) "A review on non-thermal atmospheric plasma for food preservation: Mode of action, determinants of effectiveness, and applications", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fmicb.2019.00622.

Lugli, G. A., Milani, C., Mancabelli, L., Turrone, F., van Sinderen, D. and Ventura, M. (2019) "A microbiome reality check: limitations of in silico-based metagenomic approaches to study complex bacterial communities", *Environmental Microbiology Reports*, 11(6), pp. 840–847. doi:10.1111/1758-2229.12805.

Mackenzie, J. S. and Jeggo, M. (2019) "The one health approach-why is it so important?", *Tropical Medicine and Infectious Disease*. MDPI AG. doi:10.3390/tropicalmed4020088.

Mason, C. E., Afshinnkoo, E., Tighe, S., Wu, S. and Levy, S. (2017) "International Standards for Genomes, Transcriptomes, and Metagenomes", *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*. The Association of Biomolecular Resource Facilities, 28(1), p. 8. doi:10.7171/JBT.17-2801-006.

Maury, M. M., Tsai, Y. H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E. P. C., Brisse, S.

Bibliografía

and Lecuit, M. (2016) "Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity", *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 48(3), pp. 308–313. doi:10.1038/ng.3501.

McBain, A. J., Ledder, R. G., Sreenivasan, P. and Gilbert, P. (2004) "Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. J Antimicrob Chemother, 53(5), pp. 772–777. doi:10.1093/jac/dkh168.

McMahon, M. A. S., Xu, J., Moore, J. E., Blair, I. S. and McDowell, D. A. (2007) "Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens", *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 73(1), pp. 211–217. doi:10.1128/AEM.00578-06.

McMillan, E. A., Gupta, S. K., Williams, L. E., Jové, T., Hiott, L. M., Woodley, T. A., Barrett, J. B., Jackson, C. R., Wasilenko, J. L., Simmons, M., Tillman, G. E., McClelland, M. and Frye, J. G. (2019) "Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 10(APR), p. 832. doi:10.3389/fmicb.2019.00832.

Meireles, A., Giaouris, E. and Simões, M. (2016) "Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry", *Food Research International*. Elsevier Ltd, pp. 71–85. doi:10.1016/j.foodres.2016.01.021.

Mencía-Ares, O., Argüello, H., Puente, H., Gómez-García, M., Manzanilla, E. G., Álvarez-Ordóñez, A., Carvajal, A. and Rubio, P. (2021) "Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. is influenced by production system, antimicrobial use, and biosecurity measures on Spanish pig farms", *Porcine Health Management*. Porcine Health Manag, 7(1). doi:10.1186/s40813-021-00206-1.

Molina-Mora, J. A., Campos-Sánchez, R., Rodríguez, C., Shi, L. and García, F. (2020) "High quality 3C de novo assembly and annotation of a multidrug resistant ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* genome: Benchmark of hybrid and non-hybrid assemblers", *Scientific Reports* 2020 10:1. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 1–16. doi:10.1038/s41598-020-58319-6.

Møretrø, T. and Langsrud, S. (2017) "Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc., 16(5), pp. 1022–1041. doi:10.1111/1541-4337.12283.

Moser, K. A., Zhang, L., Spicknall, I., Braykov, N. P., Levy, K., Marrs, C. F., Foxman, B., Trueba, G., Cevallos, W., Goldstick, J., Trostle, J. and Eisenberg, J. N. S. (2018) "The Role of

Bibliografía

Mobile Genetic Elements in the Spread of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* From Chickens to Humans in Small-Scale Production Poultry Operations in Rural Ecuador", *American Journal of Epidemiology*. Oxford University Press, 187(3), pp. 558–567. doi:10.1093/aje/kwx286.

Moura, A., Criscuolo, A., Pouseele, H., Maury, M. M., Leclercq, A., Tarr, C., Björkman, J. T., Dallman, T., Reimer, A., Enouf, V., Larssonneur, E., Carleton, H., Bracq-Dieye, H., Katz, L. S., Jones, L., Touchon, M., Tourdjman, M., Walker, M., Stroika, S., Cantinelli, T., Chenal-Francisque, V., Kucerova, Z., Rocha, E. P. C., Nadon, C., Grant, K., Nielsen, E. M., Pot, B., Gerner-Smidt, P., Lecuit, M. and Brisse, S. (2016) "Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*", *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group, 2(2), pp. 1–10. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.185.

NHGRI (2020) *DNA Sequencing Costs*, National Human Genome Research Institute. Available at: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data> (Accessed: 15 February 2021).

Noll, M., Kleta, S. and Al Dahouk, S. (2018) "Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany", *Journal of Infection and Public Health*. Elsevier Ltd, 11(4), pp. 572–577. doi:10.1016/j.jiph.2017.12.007.

Nygaard, A. B., Tunsjø, H. S., Meisal, R. and Charnock, C. (2020) "A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes", *Scientific Reports 2020 10:1*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 1–10. doi:10.1038/s41598-020-59771-0.

O'Neill, J. (2014) *Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations*, Review on Antimicrobial Resistance.

O'Neill, J. (2016) *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*, Archives of Pharmacy Practice. doi:10.4103/2045-080x.186181.

OECD (2007) *Analysis and Assessment of Current Protocols to Develop Harmonised Test Methods and Relevant Performance Standards for the Efficacy Testing of Treated Articles / Treated Materials*.

OECD (2013) "Guidance Document on Quantitative Methods for Evaluating the Activity of Microbiocides Used on Hard Non-Porous Surfaces", (187), pp. 35–36.

Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabulsi, A. A., Abu Ghoush, M. H., Osaili, T. M., Ayyash, M. M. and Holley, R. A. (2018) "Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria*

Bibliografía

monocytogenes Isolated from Food Products: A Comprehensive Review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc., 17(5), pp. 1277–1292. doi:10.1111/1541-4337.12387.

Oliveira, M., Tiwari, B. K. and Duffy, G. (2020) "Emerging Technologies for Aerial Decontamination of Food Storage Environments to Eliminate Microbial Cross-Contamination", *Foods*, 9(12), p. 1779. doi:10.3390/foods9121779.

Olkkola, S., Juntunen, P., Heiska, H., Hyytiäinen, H. and Hänninen, M. L. (2010) "Mutations in the *rpsL* gene are involved in streptomycin resistance in *Campylobacter coli*", *Microbial Drug Resistance*. Mary Ann Liebert Inc., 16(2), pp. 105–110. doi:10.1089/mdr.2009.0128.

Ölmez, H. and Kretzschmar, U. (2009) "Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact", *LWT - Food Science and Technology*, pp. 686–693. doi:10.1016/j.lwt.2008.08.001.

Oniciuc, E. A., Likotrafiti, E., Álvarez-Molina, A., Prieto, M., López, M. and Álvarez-Ordóñez, A. (2019) "Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain", *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd, 30, pp. 21–26. doi:10.1016/j.cofs.2018.09.002.

Oniciuc, E. A., Likotrafiti, E., Álvarez-Molina, A., Prieto, M., Santos, J. A. and Álvarez-Ordóñez, A. (2018) "The present and future of whole genome sequencing (WGS) and whole metagenome sequencing (WMS) for surveillance of antimicrobial resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes across the food chain", *Genes*, 9(5), pp. 1–28. doi:10.3390/genes9050268.

Opperman, T. J. and Nguyen, S. T. (2015) "Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition", *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), pp. 1–16. doi:10.3389/fmicb.2015.00421.

Orsi, R. H., Borowsky, M. L., Lauer, P., Young, S. K., Nusbaum, C., Galagan, J. E., Birren, B. W., Ivy, R. A., Sun, Q., Graves, L. M., Swaminathan, B. and Wiedmann, M. (2008) "Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment", *BMC Genomics*. BMC Genomics, 9. doi:10.1186/1471-2164-9-539.

Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P. and Martínez-Suárez, J. V. (2016) "The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis", *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), pp. 308–317. doi:10.1128/AEM.02824-15.

Bibliografía

Phillips, M. and Emteborg, H. (2016) "Who Needs Reference Materials?", *Journal of AOAC International*. NIH Public Access, 99(5), p. 1145. doi:10.5740/JAOACINT.16-0188.

Pitkäranta, M., Meklin, T., Hyvärinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A. and Rintala, H. (2008) "Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture", *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 74(1), pp. 233–244. doi:10.1128/AEM.00692-07.

Proctor, L. M., Creasy, H. H., Fettweis, J. M., Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Zhou, W., Buck, G. A., Snyder, M. P., Strauss, J. F., Weinstock, G. M., White, O. and Huttenhower, C. (2019) "The Integrative Human Microbiome Project", *Nature*. Nature Publishing Group, 569(7758), pp. 641–648. doi:10.1038/s41586-019-1238-8.

Qiu, Y., Zhang, J., Li, B., Wen, X., Liang, P. and Huang, X. (2018) "A novel microfluidic system enables visualization and analysis of antibiotic resistance gene transfer to activated sludge bacteria in biofilm", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 642, pp. 582–590. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.012.

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J. and Segata, N. (2017) "Shotgun metagenomics, from sampling to analysis", *Nature Biotechnology*, 35(9), pp. 833–844. doi:10.1038/nbt.3935.

Rantsiou, K., Kathariou, S., Winkler, A., Skandamis, P., Saint-Cyr, M. J., Rouzeau-Szynalski, K. and Amézquita, A. (2018) "Next generation microbiological risk assessment: opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment", *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 287, pp. 3–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.007.

RASFF (2021) "RASFF Portal". Available at: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&NewSearch=1&Keywords=Listeria> (Accessed: 19 March 2021).

Ricker, N., Spoja, B. S., May, N. and Chalmers, G. (2021) "Incorporating the plasmidome into antibiotic resistance surveillance in animal agriculture", *Plasmid*. Academic Press, 113, p. 102529. doi:10.1016/J.PLASMID.2020.102529.

Rodríguez-Beltrán, J., Rodríguez-Rojas, A., Yubero, E. and Blázquez, J. (2013) "The animal food supplement sepiolite promotes a direct horizontal transfer of antibiotic resistance plasmids between bacterial species", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 57(6), pp. 2651–2653. doi:10.1128/AAC.02363-12.

Bibliografía

Saliu, E. M., Eitinger, M., Zentek, J. and Vahjen, W. (2019) "Nutrition related stress factors reduce the transfer of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes between an *Escherichia coli* donor and a *Salmonella typhimurium* recipient in vitro", *Biomolecules*, 9(8). doi:10.3390/biom9080324.

El Sayed Zaki, M., Bastawy, S. and Montasser, K. (2019) "Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds", *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. *J Glob Antimicrob Resist*, 17, pp. 94–97. doi:10.1016/j.jgar.2018.11.022.

SCENHIR (2008) Effects of the Active Substances in Biocidal Products on Antibiotic Resistance. Available at: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm.

SCENHIR (2009) Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides The, Report.

Smith, E., Lichten, C. A., Taylor, J., Maclure, C., Lepetit, L., Harte, E., Martin, A., Ghiga, I., Pitchforth, E., Sussex, J., Dujso, E., Europe, R. and Littmann, J. (2016) *Evaluation of the EC Action Plan against the rising threats from antimicrobial resistance Final Report*.

Song, X., Wang, H. and Xu, X. (2021) "Investigation of microbial contamination in a chicken slaughterhouse environment", *Journal of Food Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 86(8), pp. 3598–3610. doi:10.1111/1750-3841.15842.

de Souza Sant, A. (2017) "Quantitative Microbiology in Food Processing: Modeling the Microbial Ecology".

Sui, H., Weil, A. A., Nuwagira, E., Qadri, F., Ryan, E. T., Mezzari, M. P., Phipatanakul, W. and Lai, P. S. (2020) "Impact of DNA Extraction Method on Variation in Human and Built Environment Microbial Community and Functional Profiles Assessed by Shotgun Metagenomics Sequencing", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 0, p. 953. doi:10.3389/FMICB.2020.00953.

Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y. and Knapp, C. W. (2019) "Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 10(AUG), p. 1933. doi:10.3389/fmicb.2019.01933.

Tourlousse, D. M., Narita, K., Miura, T., Sakamoto, M., Ohashi, A., Shiina, K., Matsuda, M., Miura, D., Shimamura, M., Ohyama, Y., Yamazoe, A., Uchino, Y., Kameyama, K., Arioka, S., Kataoka, J., Hisada, T., Fujii, K., Takahashi, S., Kuroiwa, M., Rokushima, M., Nishiyama, M., Tanaka, Y., Fuchikami, T., Aoki, H., Kira, S., Koyanagi, R., Naito, T., Nishiwaki, M., Kumagai, H., Konda, M., Kasahara, K., Ohkuma, M., Kawasaki, H., Sekiguchi, Y. and Terauchi, J. (2021) "Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for

Bibliografía

metagenomics-based human fecal microbiome measurements", *Microbiome* 2021 9:1. BioMed Central, 9(1), pp. 1–19. doi:10.1186/S40168-021-01048-3.

United Nations (2016) Political declaration of the high-level meeting of the General Assembly on antimicrobial resistance, International Organization. doi:10.1017/s0020818300030393.

Van Den Bergh, B., Michiels, J. E., Wenseleers, T., Windels, E. M., Boer, P. Vanden, Kestemont, D., De Meester, L., Verstrepen, K. J., Verstraeten, N., Fauvart, M. and Michiels, J. (2016) "Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence", *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group, 1(5). doi:10.1038/NMICROBIOL.2016.20.

Verma, T., Bhaskarla, C., Sadhir, I., Sreedharan, S. and Nandi, D. (2018) "Non-steroidal anti-inflammatory drugs, Acetaminophen and Ibuprofen, induce phenotypic antibiotic resistance in *Escherichia coli*: roles of *marA* and *acrB*", *FEMS Microbiology Letters*. NLM (Medline), 365(22), p. 251. doi:10.1093/femsle/fny251.

Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.-A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J. and Herman, L. (2013) "Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), pp. 2643–2669. doi:10.3390/ijerph10072643.

Wang, Y., Lu, J., Engelstädter, J., Zhang, S., Ding, P., Mao, L., Yuan, Z., Bond, P. L. and Guo, J. (2020) "Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation", *ISME Journal*. Springer Nature, 14(8), pp. 2179–2196. doi:10.1038/s41396-020-0679-2.

Wang, Y., Lu, J., Mao, L., Li, J., Yuan, Z., Bond, P. L. and Guo, J. (2019) "Antiepileptic drug carbamazepine promotes horizontal transfer of plasmid-borne multi-antibiotic resistance genes within and across bacterial genera", *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 13(2), pp. 509–522. doi:10.1038/s41396-018-0275-x.

Wassenaar, T. M., Ussery, D. W. and Ingmer, H. (2016) "The *qacC* Gene Has Recently Spread between Rolling Circle Plasmids of *Staphylococcus*, Indicative of a Novel Gene Transfer Mechanism", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 0(SEP), p. 1528. doi:10.3389/FMICB.2016.01528.

Webber, M. A., Whitehead, R. N., Mount, M., Loman, N. J., Pallen, M. J. and Piddock, L. J. V. (2015) "Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide

Bibliografía

exposure", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 70(8), pp. 2241–2248. doi:10.1093/jac/dkv109.

Weingarten, R. A., Johnson, R. C., Conlan, S., Ramsburg, A. M., Dekker, J. P., Lau, A. F., Khil, P., Odom, R. T., Deming, C., Park, M., Thomas, P. J., Henderson, D. K., Palmore, T. N., Segre, J. A. and Frank, K. M. (2018) "Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance", *mBio*. American Society for Microbiology, 9(1). doi:10.1128/mBio.02011-17.

Whelan, M. V. X., Ardill, L., Koide, K., Nakajima, C., Suzuki, Y., Simpson, J. C. and Cróinín, T. Ó. (2019) "Acquisition of fluoroquinolone resistance leads to increased biofilm formation and pathogenicity in *Campylobacter jejuni*", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi:10.1038/S41598-019-54620-1.

WHO (1998) Emerging and other communicable diseases: antimicrobial resistance. Report by the Director-General, Oms. Available at: <https://digicollections.net/medicinedocs/documents/s16335e/s16335e.pdf>.

WHO (2009) *Report of the 1st Meeting of the WHO AGISAR*. Available at: <http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s16735e/s16735e.pdf> (Accessed: 4 February 2021).

WHO (2013) Strategic and Technical Advisory Group on Antimicrobial Resistance. Report of the first meeting Geneva, 19-20 September 2013. Available at: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/amr_stag_meetingreport0913.pdf?ua=1.

WHO (2014) Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. doi:10.1016/j.giec.2020.06.004.

WHO (2015a) Antimicrobial resistance WHO webpage, *Der Internist*. doi:10.1007/s00108-015-3709-9.

WHO (2015b) Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, *Microbe Magazine*. doi:10.1128/microbe.10.354.1.

WHO (2017a) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, Organización Mundial de la Salud. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/> (Accessed: 8 March 2021).

WHO (2017b) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at:

Bibliografía

<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Accessed: 24 March 2021).

WHO (2018) "Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance: landscape paper", *World Health Organization*, pp. 1–42.

WHO (2021a) *UN Interagency Coordination Group (IACG) on Antimicrobial Resistance, WHO*. Available at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/about/en/> (Accessed: 12 February 2021).

WHO (2021b) *WHO | Antimicrobial resistance in the food chain*. Available at: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/amrfoodchain/en/ (Accessed: 12 February 2021).

Windels, E. M., Michiels, J. E., Fauvart, M., Wenseleers, T., Van den Bergh, B. and Michiels, J. (2019) "Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates", *ISME Journal*. *ISME J*, 13(5), pp. 1239–1251. doi:10.1038/s41396-019-0344-9.

Xiao, Y., Angulo, M. T., Lao, S., Weiss, S. T. and Liu, Y. Y. (2020) "An ecological framework to understand the efficacy of fecal microbiota transplantation", *Nature Communications*. *Nature Research*, 11(1), pp. 1–17. doi:10.1038/s41467-020-17180-x.

Yu, Z., Wang, Y., Lu, J., Bond, P. L. and Guo, J. (2021) "Nonnutritive sweeteners can promote the dissemination of antibiotic resistance through conjugative gene transfer", *The ISME Journal 2021*, pp. 1–14. doi:10.1038/s41396-021-00909-x.

Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O. and Aarestrup, F. M. (2017) "PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 72(10), pp. 2764–2768. doi:10.1093/jac/dkx217.

Zhou, Y. H. and Gallins, P. (2019) "A review and tutorial of machine learning methods for microbiome host trait prediction", *Frontiers in Genetics*. *Frontiers Media S.A.*, 10(JUN), p. 579. doi:10.3389/fgene.2019.00579.

Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., Hashsham, S. A. and Tiedje, J. M. (2013) "Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(9), pp. 3435–3440. doi:10.1073/pnas.1222743110.

Zunino, P. (2018) "Historia y perspectivas del enfoque 'Una Salud'", *Veterinaria (Montevideo)*, 54(210), pp. 46–51. doi:10.29155/vet.54.210.8.

7. Anexos

Anexos

Material suplementario del capítulo I:

El material suplementario, así como la versión online del manuscrito, pueden consultarse en la siguiente url https://journals.asm.org/doi/suppl/10.1128/AEM.00102-20/suppl_file/aem.00102-20-s0001.pdf

Material suplementario del capítulo III

<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0168160521000027-mmc1.pdf>

Supplementary Fig. S1. Distribution of ST9 (n=360 isolates) vs other ST (n=2926). A: Geographical distribution of L. monocytogenes isolates, B: Source of isolation (food, environmental, clinical, or missing/unknown) of L. monocytogenes isolates. C: Detailed subclassification of the isolation source for those isolates from food products (ST9, n=214; other ST, n=991).

Material suplementario capítulo IV

El material suplementario, así como la versión online del manuscrito, pueden consultarse en la siguiente url <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>.