

# Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España (2)

Número de referencia: AESAN-2022-008

Informe aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 29 de junio de 2022

## Grupo de trabajo

**Carlos M. Franco Abuín (Coordinador), Carlos Alonso Calleja, Pablo Fernández Escámez, Victoria Moreno Arribas, Gloria Sánchez Moragas y Antonio Valero Díaz**

## Comité Científico

<b>Carlos Alonso Calleja</b> Universidad de León	<b>Carlos M. Franco Abuín</b> Universidade de Santiago de Compostela	<b>Sonia Marín Sillué</b> Universitat de Lleida	<b>Magdalena Rafecas Martínez</b> Universitat de Barcelona
<b>Houda Berrada Ramdani</b> Universitat de València	<b>Ángel Gil Izquierdo</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	<b>Francisco J. Morales Navas</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	<b>María del Carmen Recio Iglesias</b> Universitat de València
<b>Irene Bretón Lesmes</b> Hospital Gregorio Marañón de Madrid	<b>María José González Muñoz</b> Universidad de Alcalá de Henares	<b>Victoria Moreno Arribas</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	<b>Ana María Rivas Velasco</b> Universidad de Granada
<b>Araceli Díaz Perales</b> Universidad Politécnica de Madrid	<b>Isabel Hernando Hernando</b> Universitat Politècnica de València	<b>Silvia Pichardo Sánchez</b> Universidad de Sevilla	<b>Gloria Sánchez Moragas</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>Pablo Fernández Escámez</b> Universidad Politécnica de Cartagena	<b>Esther López García</b> Universidad Autónoma de Madrid	<b>María del Puy Portillo Baquedano</b> Universidad del País Vasco	<b>Antonio Valero Díaz</b> Universidad de Córdoba

## Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

**Gestión técnica del informe AESAN:** María Ángeles Carlos Chillerón

## Resumen

En el presente informe se aborda la prospección sobre peligros biológicos que actualmente no se incluyen en los programas de control oficial en España en algún tipo de alimento y que pueden suponer un riesgo para la población. Se trata de un informe que completa y actualiza el realizado en 2018 por parte del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2018). Se consignan, en primer lugar, una serie de bacterias que constituyen una importante causa de infecciones nosocomiales, debido al incremento del número de cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp., de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. También se aborda el estudio de prevalencia y posible control de la presencia de *Bacillus cereus* y *Cronobacter* spp.

en harinas de cereales y otras y también la revisión de *Campylobacter jejuni* y/o *Campylobacter coli* en carnes, al margen de las carnes de ave, así como el estudio de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga. En estos dos últimos casos, se trata de agentes biológicos mucho más conocidos desde la óptica del control alimentario, si bien, en el caso de *Campylobacter* spp. existen medidas de control en carnes de ave, pero no en otro tipo de carnes como son la carne de vacuno o porcino y, en el caso de *E. coli* productores de toxinas Shiga, tampoco se ha abordado de forma específica el control de este tipo concreto de cepas patógenas en los alimentos. Finalmente, se ha señalado un peligro vírico como es la encefalitis vírica transmitida por garrapatas que puede ser transmitida a las personas por el consumo de leche cruda o productos lácteos crudos.

El estudio prospectivo arroja la necesidad de conocer la prevalencia de bacterias multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* en alimentos en España, sobre todo en alimentos listos para el consumo como pueden ser las ensaladas y alimentos frescos de origen vegetal. Esto es especialmente importante por la falta de datos de prevalencia de estas bacterias en alimentos en España, llevándose a cabo, sin embargo, investigaciones en alimentos en países de nuestro entorno. También se constata la necesidad de incluir a *C. jejuni* y/o *C. coli* en las investigaciones en carnes de vacuno y porcino, ya que la incidencia de estos patógenos de transmisión alimentaria en las personas no queda explicada únicamente por la presencia de estos agentes en carnes de ave, poniéndose de manifiesto su presencia en otros animales de abasto. Análogamente, en el caso de *E. coli* productor de toxinas Shiga se han podido constatar los brotes que ha habido en España en los últimos 25 años, lo cual aconseja su control en carnes de vacuno, leche cruda y verduras de hoja. En lo que se refiere a *Cronobacter* spp. y *B. cereus*, se puede demostrar la importancia de estos agentes, dada su supervivencia en materiales pulverulentos como las harinas de distintos orígenes, incluidos los cereales, si bien los brotes consignados no parecen indicar una alta prevalencia. Para el único peligro vírico señalado, cabe indicar que la gran dispersión de las garrapatas que pueden transmitir este virus, junto con el posible consumo de leche cruda, aconseja la investigación del mismo en productos lácteos crudos, aunque el estudio de la capacidad infectiva real de dicho virus no sea fácil de establecer con métodos analíticos sencillos. Con esta última salvedad, la investigación para el control de todos estos peligros biológicos en alimentos es posible, existiendo metodologías clásicas o avanzadas lo suficientemente robustas para cada caso.

### Palabras clave

*Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Cronobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, STEC, toxinas Shiga, encefalitis vírica, garrapatas, *Ixodes*, multirresistencias.

## Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the prospection of biological hazards of interest in food safety in Spain (2)

### Abstract

This report addresses the prospection of biological hazards for some types of food that may pose a risk to the population and that are not currently included in the official control programs in Spain. It completes and updates the 2018 report by the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN, 2018). A number of bacteria that are significant contributors to nosocomial infections due to the increase in the number of multi-resistant strains of *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* are listed first. It is also addressed the study of the prevalence and possible control of *Bacillus cereus* and *Cronobacter* spp. presence in cereal flours and others, the revision of *Campylobacter jejuni* and/or *Campylobacter coli* in meats other than poultry, as well as the study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. These latter two biological agents are much better known from the food control perspective, although there are control measures for *Campylobacter* spp. in poultry meat and not in other types of meat such as beef or pork and in the case of *E. coli*, producers of Shiga toxins, the control of this particular type of pathogenic strains in food has not been specifically addressed either. Finally, tick-borne viral encephalitis, which can be transmitted to humans through the consumption of raw milk or raw dairy products, has been indicated as a viral hazard.

The prospective study shows the need to determine the prevalence of multi-resistant bacteria of *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* in foods in Spain, especially in ready-to-eat foods such as salads and fresh plant-based foods. This is especially important due to the lack of data on the prevalence of these bacteria in foods in Spain. However, food research is carried out in neighbouring countries. It is also necessary to include *C. jejuni* and/or *C. coli* in the investigations of beef and pork, since the incidence of these foodborne pathogens in humans is not explained solely by the presence of these agents in poultry meat, being their presence in other animals for slaughter also evident. Similarly, outbreaks of Shiga toxin-producing *E. coli* have been reported in Spain over the last 25 years, which makes it advisable to control them in beef, raw milk and leafy vegetables. With regard to *Cronobacter* spp. and *B. cereus*, the importance of these agents can be demonstrated given their survival in powdery materials such as flours of different origins, including cereals, although the reported outbreaks do not seem to indicate a high prevalence. As regards the only viral hazard mentioned, it should be noted that the wide dispersion of the ticks that can transmit this virus, together with the potential consumption of raw milk, makes it advisable to investigate it in raw milk products. However, the study of the actual infective capacity of this virus is not easy to establish with simple analytical methods. With this last exception, research for controlling all these biological hazards in food is possible, with classical or advanced methodologies that are robust enough, available for each case.

## Key words

*Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Cronobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, STEC, Shiga toxin, viral encephalitis, ticks, *Ixodes*, multiresistance.

## Cita sugerida

Comité Científico AESAN. (Grupo de Trabajo) Franco, C.M. (Coordinador), Alonso, C., Fernández, P., Moreno, V., Sánchez, G. y Valero, A. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España (2). *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 2022, 36, pp: 161-207.

## 1. Introducción

A lo largo de la cadena alimentaria pueden estar presentes, incorporarse o producirse distintos peligros de tipo biológico que pueden suponer un riesgo para el consumidor.

Los programas de control oficial tratan de garantizar la realización de controles de los peligros de interés en seguridad alimentaria en función del riesgo, pero solo afectan a aquellos parámetros con límites máximos fijados en determinados alimentos.

Sin embargo, existen otros peligros de interés en seguridad alimentaria para los que no existe una regulación específica o existe, pero solo en determinados alimentos, que pueden ser objeto de programas de prospección con el fin de obtener datos que, además de proteger al consumidor de una exposición puntual a un peligro, permitan realizar una evaluación del riesgo.

Además, la identificación de nuevos peligros para los que puede producirse una exposición significativa, o la evaluación del riesgo derivado de una exposición o susceptibilidad nuevas o incrementadas significativamente a un peligro conocido, es importante, no solo a efectos de un eventual control de estos peligros emergentes, sino también de promover la investigación y mejorar su conocimiento por parte de los consumidores y de la comunidad científica.

En este sentido, en 2018, el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) publicó un primer informe sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España (AESAN, 2018) en el cual se señalaban los siguientes:

- Virus de transmisión alimentaria: norovirus, virus de la Hepatitis A y virus de la Hepatitis E en moluscos bivalvos y vegetales frescos, y virus de la Hepatitis E en productos derivados de carne de cerdo.
- Bacterias: *Yersinia enterocolitica* en carne de porcino, *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en productos de la pesca y moluscos bivalvos, *Escherichia coli* (patotipos no STEC) en vegetales frescos y *Clostridium difficile* en carne fresca.
- Parásitos: protozoos (*Toxoplasma* y *Cryptosporidium*) en carne fresca y vegetales frescos.

Con el fin de incorporar más peligros de interés a posibles estudios prospectivos, se solicita al Comité Científico que realice una nueva revisión de los peligros de mayor interés en seguridad alimentaria en España que no cuenten con una regulación específica, identificándolos y señalando aquellos alimentos o condiciones que, *a priori*, podrían implicar un mayor riesgo para el consumidor.

## 2. Peligros biológicos y alimentos propuestos

En el presente documento se consigna el estudio prospectivo de la documentación científica reciente sobre la presencia de ciertas bacterias que suelen conllevar múltiples determinantes de resistencia a antibióticos usualmente empleados en el tratamiento de procesos causados por dichas bacterias, como es el caso de *Acinetobacter baumannii*, otros *Acinetobacter* multirresistentes y *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes en carne, leche y vegetales y/o ensaladas listas para el consumo, así como *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes en alimentos de origen vegetal. La presencia de *Bacillus cereus* y *Cronobacter* spp. en harinas. También el estudio de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en carnes de porcino y vacuno y otras carnes. También la presencia de

*E. coli* productores de toxinas Shiga en carnes de vacuno, leche cruda y verduras de hoja. Finalmente, como único peligro vírico, la encefalitis por garrapatas en leche cruda y productos lácteos no pasteurizados de cabra, oveja y vacuno.

### 3. *Acinetobacter* spp. multirresistente

#### 3.1 Generalidades

El empleo de antimicrobianos tanto en personas como animales suele ser motivo de justificación del incremento, cada vez mayor, del número de bacterias multirresistentes. A pesar del creciente número de antimicrobianos que se pueden emplear en el tratamiento de las enfermedades en los últimos años, quizás ya en la última década del pasado siglo, se han ido “popularizando” ciertos microorganismos cuya denominación inicialmente no parece tener una connotación con enfermedades concretas en las personas. Una de estas bacterias es *Acinetobacter*. El género *Acinetobacter* fue inicialmente descrito en 1911 por Beijerinck (1911), siendo seguramente la especie más conocida e importante de este género *Acinetobacter baumannii*. Esta fue descrita en 1986 por Bouvet y Grimont (1986), si bien el género *Acinetobacter* comprende actualmente alrededor de 80 especies, aunque su asignación a nivel taxonómico es compleja. Un aspecto de la máxima relevancia de este agente es que, mientras en las últimas décadas del siglo pasado las cepas aisladas de *A. baumannii* eran en general sensibles a la mayoría de los agentes antimicrobianos, hoy en día cada vez es más frecuente aislar cepas multirresistentes, lo que supone una preocupación a nivel mundial. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado la resistencia antimicrobiana como uno de los tres problemas de mayor importancia para la salud de las personas (Bassetti et al., 2011).

#### 3.2 Impacto de la enfermedad en las personas

El género *Acinetobacter* está compuesto por cocobacilos Gram negativos, aerobios estrictos, no fermentadores, inmóviles y oxidasa negativos. Las especies incluidas en el grupo de *A. baumannii* son las especies más frecuentemente relacionadas con infecciones nosocomiales en todo el mundo. De hecho, *A. baumannii* se recoge dentro del acrónimo ESKAPE que engloba a bacterias capaces de “escapar” de la acción de los antimicrobianos (Pendleton et al., 2013). En relación a las bacterias multirresistentes, *A. baumannii* se puede considerar un microorganismo paradigmático (Souli et al., 2008) y se ha relacionado su frecuente resistencia no sólo con cepas de origen clínico procedentes de pacientes humanos sino también de origen animal (Zhang et al., 2015) y de prácticas empleadas en ocasiones en producción de animales de abasto (Adeyemi et al., 2022). A este respecto también se menciona la transformación natural de estas bacterias para adquirir resistencia (Domingues et al., 2019) así como la participación de ciertas proteínas de membrana (Han et al., 2022). En las últimas décadas, la diseminación de cepas con multirresistencia de *A. baumannii* se ha traducido en una multiplicación de casos graves a nivel hospitalario que precisan de cuidados intensivos (Mc Connell et al., 2013). En las personas, puede causar neumonía, además, las mayores ratios de mortalidad por neumonía aparecen en enfermos con el uso de ventilación asistida, lo cual en los años de pandemia ha alcanzado un interés especial a causa del COVID 19, y su tratamiento con ventilación asistida en muchos casos de pacientes hospitalizados con neumonía. De hecho, es múltiple la bibliografía que

aborda los brotes hospitalarios de *A. baumannii* en pacientes con COVID (Wu et al., 2021) (Russo et al., 2022). Estas bacterias también causan bacteriemia, endocarditis, entre otras patologías, con la problemática de la supervivencia del agente en diverso material hospitalario y personal que se ha visto expuesto a este agente (Mc Connell et al., 2013), lo cual hace que se puedan desarrollar muchos casos a nivel hospitalario e incluso transferirse la bacteria de unos hospitales a otros. Dentro de los hospitales, el proceso puede ser tan severo que puede causar una mortalidad incluso superior al 60 % en pacientes con neumonía tratados con ventilación asistida e infectados con *A. baumannii* multi-resistente (Ciginskiene et al., 2019).

El tratamiento de las infecciones con *A. baumannii* era sencillo en la década de los 70 del pasado siglo, aunque el rápido aumento de las resistencias ha hecho que dicho tratamiento vaya evolucionando. Los  $\beta$ -lactámicos carbapenémicos como el imipenem y el meropenem son antimicrobianos de elección en estas infecciones. Sin embargo, también se señala la colistina como antimicrobiano para el tratamiento de este agente (Asif et al., 2018). Se indica, en cualquier caso, la existencia de un alto porcentaje de cepas resistentes a los  $\beta$ -lactámicos carbapenémicos (CRAB, *Carbapenem Resistant Acinetobacter baumannii*), de tal modo que se proponen nuevas estrategias para el tratamiento, en concreto el empleo de tigeciclina (Isler et al., 2019) y minociclina (Nair, 2018) (Isler et al., 2019).

### 3.3 Prevalencia en alimentos

Si bien no está demostrada una transmisión específica de este tipo de agentes a partir de los alimentos, la presencia de estas bacterias en ellos supone un riesgo inherente para las personas. Esto viene determinado, por una parte, por el incremento del número de personas susceptibles a las infecciones con agentes oportunistas (inmunosuprimidas, personas de edad avanzada, etc.) así como por la mayor facilidad para la distribución de estos agentes hacia los hospitales y aumentar la difusión de las resistencias hacia otros microorganismos. Sin embargo, sí que se ha documentado la transmisión de *A. baumannii* a través del agua de bebida (Umezawa et al., 2015).

Está claramente establecida la presencia de *A. baumannii* en diversos tipos de alimentos. Así, Guo et al. (2021) señalan que hasta un 4,52 % de las bacterias presentes en la leche pertenecen al género *Acinetobacter*, siendo *A. Iwoffii* una de las tres especies más prevalentes en un estudio que analizó 355 muestras de leche de diversas regiones de China. Asimismo, se han encontrado bacterias del grupo *A. baumannii/calcoaceticus* en un total del 39,4 % de muestras de leche, yogur y queso en Brasil (Rabêlo et al., 2021). También han sido aislados *A. baumannii* en alimentos africanos tradicionales fermentados obtenidos de aceite de habas (Okorie et al., 2017). El desarrollo de la fermentación como elemento característico de muchos alimentos es clave en relación a la microbiota característica que poseen este tipo de productos (Abouelnaga et al., 2016). Resulta importante el hecho de que puedan aparecer estos agentes en alimentos fermentados dado el aumento del consumo de alimentos funcionales y suplementos con probióticos. En estos casos se trata de añadir microorganismos vivos que mejoren o repongan la funcionalidad del aparato digestivo de las personas y supongan una mejora nutricional y de salud (FAO/OMS, 2006). De este modo, resulta preocupante que algunos estudios (Mazzantini et al., 2021) han mostrado la contaminación de suplementos de esta naturaleza con *Acinetobacter* spp., señalándose recuentos de poblaciones

de *A. baumannii* por encima de  $10^{11}$  por dosis de probiótico (Celandroni et al., 2019). Asimismo, *Acinetobacter* ha demostrado una capacidad para persistir en fórmulas infantiles pulverulentas (Juma et al., 2016), sobreviviendo a la desecación.

En relación con la prevalencia en carnes; se pueden encontrar estudios en carne cruda, en Suiza. Lupo et al. (2014) determinaron un 25 % de muestras de carne positivas a *A. baumannii* entre los meses de noviembre de 2012 y mayo de 2013; en este caso la carne de pollo fue la más frecuentemente contaminada con este agente. En Portugal se identificó en múltiples tipos de carnes (Carvalho et al., 2017a), y se señala que *Acinetobacter* spp. fue aislado de todas las muestras de carnes incluidas en el estudio (pollo, pavo, vacuno y cerdo). Se identificaron 13 especies distintas, con una gran diversidad genética y un 18,7 % de prevalencia de las cepas pertenecientes al grupo de *A. baumannii*, el segundo grupo más prevalente sobre un total de 223 aislados. En Perú se aislaron también en carnes varias especies de *Acinetobacter* (Marí-Almirall et al., 2019). Investigadores chinos ponen de manifiesto también la gran prevalencia de agentes del género *Acinetobacter* en carne de cerdo en los primeros momentos tras refrigeración. Si bien esta prevalencia va disminuyendo al ir aumentando el período de refrigeración en favor de *Pseudomonas* (Wang et al., 2022a). En China también se investigó la presencia de este agente en *bacon* con valores, en este caso, más bajos, que suponen el 8,65 % (Wang et al., 2022b). *Acinetobacter* también ha sido aislado en productos frescos listos para el consumo o que no requieren un tratamiento culinario para ser consumidos como son componentes de ensaladas como la lechuga o frutas (Carvalho et al., 2017b). En este caso *Acinetobacter* se aisló en un 77,9 % de las muestras, siendo un 11 % de las cepas aisladas del grupo *A. baumannii*. Finalmente, se puede señalar que *Acinetobacter* es un género ubícuo en el agua (Vaz-Moreira et al., 2017), habiéndose detectado asimismo en agua para consumo (Van Assche et al., 2019).

En pescado también se ha identificado *Acinetobacter*, tanto en España (González et al., 2000) como en otros países, en proporciones similares a las obtenidas para otros productos, e incluso se han determinado molecularmente cepas relacionadas con enfermedades en las personas (Houang et al., 2001).

Existía una evidencia de contaminación a nivel hospitalario de superficies, agua, etc. por esta bacteria. Sin embargo, también aparece contaminación por estos agentes en superficies de procesamiento de alimentos (Xu et al., 2022), lo cual justifica la enorme prevalencia que parece haber en todos los alimentos en general. Los estudios de prevalencia de los últimos años parecen mostrar resultados más consistentes probablemente a causa de la generalización de los estudios mediante técnicas basadas en secuenciación masiva de última generación. Sin embargo, con la excepción del estudio de González et al. (2000), no se encuentran resultados de prevalencia en alimentos en España para estas bacterias.

Es de resaltar el hecho de que, aunque es abundante el número de publicaciones que investigan *Acinetobacter* y *A. baumannii* en personas, animales o alimentos, en la inmensa mayoría de los casos no se dan valores cuantitativos de las poblaciones determinadas para estas bacterias, que parecen oscilar entre las 50 y 1000 UFC/g en datos obtenidos de alimentos vegetales (Berlau et al., 1999).

En la mayoría de los trabajos citados se señalan estudios de antibiorresistencia de las cepas de *Acinetobacter* o *A. baumannii* frente a diversos antimicrobianos. Sin embargo, los resultados

publicados no resultan suficientemente clarificadores. Se observó baja prevalencia de resistencia frente a antimicrobianos y la ausencia de multirresistencia (Marí-Almirall et al., 2019) en carne en Perú. En Suiza (Lupo et al., 2014) los aislados de *A. baumannii* obtenidos de la carne fueron en general susceptibles a antibióticos clínicamente relevantes sin observarse resistencias frente a antimicrobianos carbapenémicos. También se señala la existencia de resistencias frente a sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina y aminoglucósidos, pero solo fueron detectadas resistencias frente al meropenem o imipenem (antimicrobianos carbapenémicos) de forma esporádica (Carvalho et al., 2017a). Sin embargo, estos autores portugueses señalan que el 51,2 % de las cepas fueron consideradas como resistentes a varios antimicrobianos (MDR, *Multi Drug Resistance*) y el 9,6 % como resistentes de forma extensa a los antimicrobianos (XDR, *extensively drug resistance*), siendo para el grupo de *A. baumannii* el 38,7 % MDR.

### 3.4 Métodos de determinación

Los estudios de prevalencia más recientes se han llevado a cabo mediante el empleo de sistemas basados en secuenciación masiva (Guo et al., 2021), basando su identificación en secuencias del 16S rRNA. Esto no permite determinar aspectos como son la resistencia a los antimicrobianos. Sin embargo, *A. baumannii* también fue aislado de alimentos mediante el empleo de diversos medios de cultivo dentro del contexto de lo que es la microbiología clásica como el medio modificado de Leeds para *Acinetobacter* (MLAM, *Modified Leeds Acinetobacter Medium*) que contiene vancomicina (Houang et al., 2001), o medios selectivos/cromogénicos para enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (Lupo et al., 2014). Quizás el medio de cultivo que más se emplea en su aislamiento es el CHROMagar™ *Acinetobacter*. Sin embargo, también se han aislado microorganismos de este género a partir de medios para el recuento y aislamiento de enterobacterias como el agar MacConkey (Marí-Almirall et al., 2019) o MacConkey adicionado con diversos antimicrobianos como la amoxicilina, cefradina y fosfomicina. Estos medios han sido comparados por Moran-Gilad et al. (2014). También se han propuesto medios de enriquecimiento para la investigación en alimentos dentro del contexto de la microbiología clásica (Carvalho et al., 2016) como el medio de enriquecimiento de Baumann y el de Dijkshoorn. La identificación preliminar fenotípica es sencilla y la confirmación a nivel de especie mediante medios moleculares incluyendo genotipado mediante electroforesis en campo pulsante y/o estudio de la secuencia del gen *rpoB* (902 pb) (Rafel et al., 2015) (Carvalho et al., 2017a). También se han empleado otros métodos de identificación como el MALDI-TOF (Toh et al., 2015). La verificación de las resistencias en las cepas identificadas se puede hacer por medios fenotípicos, siguiendo las directrices del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI (2012). Existen múltiples artículos en los que se referencian los genes responsables de las resistencias de *Acinetobacter* (Tavakol et al., 2018) (van der Kolk et al., 2019).

## 4. *Klebsiella pneumoniae* multirresistente

### 4.1 Generalidades

*K. pneumoniae* es otro de los agentes incluidos dentro del acrónimo ESKAPE. Se trata de una enterobacteria con una marcada capacidad para hacerse resistente a múltiples antimicrobianos, lo

cual sin duda es uno de los principales aspectos a tener en cuenta. Al igual que otras bacterias incluidas en el acrónimo ESKAPE, en la última década se ha multiplicado la prevalencia de procesos causados por este agente y la prevalencia asociada a cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes a los antimicrobianos (Wyres et al., 2020).

*K. pneumoniae* es originalmente una enterobacteria de metabolismo fermentativo y, en este sentido, diferente de *Acinetobacter* spp.

#### 4.2 Impacto de la enfermedad en las personas

Aunque clásicamente *K. pneumoniae* era considerada una bacteria causante de procesos pulmonares adquiridos de forma comunitaria (Ko et al., 2002). Hoy en día se presenta como una de las bacterias más importantes que causan procesos patológicos en las personas al margen de las neumonías, siendo normalmente a nivel extraintestinal y, al igual que los otros agentes incluidos dentro del acrónimo ESKAPE, uno de los principales agentes nosocomiales, es decir, causantes de infecciones a nivel hospitalario. Sin embargo, aunque las neumonías y/o procesos urinarios causadas por estas bacterias en el hospital son importantes, también hay un número importante de bacteremias adquiridas a nivel comunitario causadas por este agente (Meatherall et al., 2009).

Asimismo, ha sido puesto de manifiesto el hecho de que las personas portadoras de *K. pneumoniae* a nivel intestinal suponen un factor predisponente para la presentación de abscesos hepáticos en varios países de Asia (Hartantyo et al., 2020) y este agente ha sido identificado como agente etiológico en un 6 % de casos de abscesos hepáticos en algunos estudios en España (Barreiro, 2018). También se debe resaltar la incidencia en España de personas portadoras de microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, siendo *K. pneumoniae* uno de los microorganismos más frecuente, con un 20 % de las bacterias identificadas en el estudio (Díaz-Agero et al., 2019).

Al margen del hecho de la adquisición a nivel comunitario de este agente de procesos extraintestinales y a diferencia de otros agentes de importancia básicamente nosocomial, hemos de señalar que se ha informado de la adquisición de una variante enteroinvasiva de *K. pneumoniae* a partir del consumo de un producto cárnico (hamburguesa) (Sabota et al., 1998), siendo concordantes los aislados del agente a nivel del producto cárnico y a partir de la persona enferma. Sin embargo, a pesar de los años transcurridos, no se han confirmado otros casos similares desde entonces. En cualquier caso, aunque de forma indirecta en la mayoría de los casos, la bibliografía científica con frecuencia relaciona los alimentos como transmisores de este agente (Haryani et al., 2007) (Gundogan y Avci, 2013) (Peng et al., 2021) así como a los animales productores de carne (Davis y Price, 2016) (Projahn et al., 2019) (Aguilar-Bultet et al., 2020).

De todo lo anterior se desprende la existencia de neumonías clásicas de adquisición comunitaria y casos nosocomiales que incluyen neumonías y otros procesos y también casos comunitarios graves, para señalar finalmente la posible transmisión alimentaria. Los distintos casos señalados dependen, como se puede suponer, del tipo de cepa y más concretamente de la virulencia de esta. De este modo se pueden clasificar las cepas de este agente en varios grupos, unas serían las *K. pneumoniae* clásicas, y por otra parte tendríamos las cepas hipervirulentas, que son variantes invasivas responsables de los abscesos hepáticos y otros procesos de gravedad. En este último

caso se trata de bacterias con una importante batería de factores de virulencia que se pueden ver agravados con la adquisición de multiresistencia. Los procesos causados por las cepas clásicas suelen ser a nivel hospitalario, sin embargo, los causados por cepas hipervirulentas suelen ser originados a nivel comunitario y en el caso de los procesos por cepas hipervirulentas multiresistentes, el origen es tanto nosocomial como comunitario (Zhu et al., 2021). Estudios realizados sobre el origen de las múltiples resistencias a los antimicrobianos que presentan estos agentes confirman que la mayor parte de genes de resistencia frente a antimicrobianos de relevancia clínica son adquiridos horizontalmente (Wyres et al., 2020).

*K. pneumoniae* es naturalmente resistente a la ampicilina, pero también hay una gran cantidad de genes que contribuyen a la resistencia de esta bacteria frente a múltiples antimicrobianos. Se ha señalado asimismo que al igual que en el caso de *A. baumannii* la resistencia adquirida frente a los antimicrobianos carbapenémicos es de la mayor importancia y se ha relacionado con la posible transmisión a las personas a partir de alimentos vegetales frescos listos para el consumo (Soliman et al., 2021).

### 4.3 Prevalencia en alimentos

Tal y como hemos señalado, a pesar de la consideración de esta bacteria como agente causante de infecciones nosocomiales, son numerosas las publicaciones en las que se investiga su prevalencia en alimentos o bien se relaciona con la seguridad alimentaria. De este modo, en productos crudos y listos para el consumo se recuperó *K. pneumoniae* en el 21 % de las muestras investigadas en Singapur, con altos porcentajes de positividad, de hasta el 80 % en algunos grupos de muestras de alimentos crudos (vegetales) y porcentajes algo menores, pero que llegan al 27 %, en platos preparados listos para el consumo (Hartantyo et al., 2020). En China se ha hecho más investigación en alimentos. Se puede citar el trabajo de Guo et al. (2016), quienes determinaron una prevalencia del 9,9 % en muestras de alimentos contaminadas con *K. pneumoniae*, oscilando los valores entre el 7,5 % para muestras de productos del mar crudos congelados y el 13,8 % de muestras de pollo crudo fresco (Guo et al., 2016). Zhang et al. (2018) analizaron 1200 muestras de alimentos vendidos al por menor y listos para el consumo, incluidos vegetales y carnes en 24 ciudades de China. El 5 % de las muestras fueron positivas a *Klebsiella* spp. y realizaron además una caracterización fenotípica y genotípica de las cepas. En Malasia, el 32 % de las muestras de alimentos obtenidos de mercados callejeros fueron positivas a *K. pneumoniae* (Haryani et al., 2007). En Oklahoma, Estados Unidos, también se investigó la presencia de este agente y sus resistencias a los antimicrobianos en granjas de vacuno, pavos y pollos, así como en carnes de estos animales obtenidos de tiendas o supermercados. Más del 70 % de las muestras de carne de pavo fueron positivas a *K. pneumoniae* multiresistentes, con valores significativamente más bajos para el caso de carnes de vacuno (15 %) y pollo (30 %) (Kim et al., 2005). En Costa de Marfil se ha estudiado la presencia de *K. pneumoniae* en restaurantes del campus universitario de Abiyán, así como su perfil de resistencias a diversos antimicrobianos, hallándose hasta un 20,8 % en muestras de sopa de pescado y un 37 % en muestras de pescado frito (Kone et al., 2022). La preocupación por este microorganismo también ha llegado a Europa, realizándose un estudio multicéntrico para poner a punto metodologías de detección de *Klebsiella* y también para estudiar la prevalencia en carnes de pollo

y ensaladas listas para el consumo (Rodrigues et al., 2022). Los resultados arrojaron valores de prevalencia de entre el 50 y 60 % en carne de pollo y entre el 20 y el 30 % en ensaladas, según se empleen métodos de cultivo convencionales o PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*). Los países involucrados fueron Dinamarca, Irlanda, Italia, Francia y Austria. Estos valores, en comparación con los citados en China y otros países, se antojan relativamente altos, quizás también por la mejora de la metodología empleada. Si bien hay mucha información sobre caracterización de cepas de origen clínico en nuestro país, no hemos encontrado estudios específicos sobre la prevalencia de este microorganismo en alimentos en España.

#### 4.4 Métodos para detectar *Klebsiella pneumoniae*

Ya datan del siglo pasado algunos métodos para la detección de *Klebsiella* spp. de forma selectiva (Bagley y Seidler, 1978). Pero en nuestro siglo, *K. pneumoniae* fue aislada a partir del empleo de medios de cultivo clásicos y bien conocidos y relativamente poco selectivos, como el agar MacConkey (Kim et al., 2005), llegando el empleo del agar MacConkey hasta hoy en día. Así, en el estudio llevado a cabo por Zhang et al. (2018), uno de los que analizan un mayor número de muestras de alimentos, emplearon caldo nutriente para enriquecer las muestras y posteriormente emplearon agar MacConkey para aislar este agente, aislando colonias de aspecto mucoso de color rosa, empleando posteriormente pruebas fenotípicas clásicas como el uso de *kits* API 20E de BioMérieux® también en el trabajo de Hartantyo et al. (2020). Otros medios de cultivo clásicos para enterobacterias también se han empleado para el aislamiento de estos agentes de alimentos como el agar eosina azul de metileno (Gundogan y Avci, 2013). Sin embargo, en la actualidad, dada la preocupación por la prevalencia de esta bacteria en alimentos en Europa, y la falta de una auténtica estandarización en los medios de cultivo y metodologías empleados, se han realizado estudios para definir métodos de cultivo óptimos para la recuperación de estas bacterias de alimentos, probando alimentos como carne de pollo y ensaladas listas para el consumo (Rodrigues et al., 2022). En este sentido se ha empleado como diluyente de enriquecimiento agua de peptona tamponada y caldo LB (caldo de lisogenia), suplementado con ampicilina. En este artículo se han estudiado también, para el aislamiento, medios de cultivo sólidos selectivos, incluyéndose medios comerciales cromogénicos como el comercializado por Sigma® o el comercializado por Liofilchem® y también medios no comerciales ya clásicos. El protocolo optimizado final incluye el empleo de agua de peptona tamponada, con incubación a dos temperaturas y el empleo de agar SCAI (no comercial) (van Kregten et al., 1984) (Passet y Brisse, 2015) para el aislamiento. *K. pneumoniae* aparece de color amarillo en agar SCAI. Sin embargo, los medios cromogénicos comerciales también obtienen buenos resultados, en general, en la distinción de *Klebsiella* spp. de otros géneros. Al margen de los sistemas basados en la microbiología clásica para el aislamiento y la posterior caracterización de estas bacterias, están disponibles métodos moleculares para la detección y caracterización de estas bacterias, como la detección de determinados genes (Zhang et al., 2018) o el empleo del MALDI-TOF para la identificación (Rodrigues et al., 2018).

Para la determinación de la antibiorresistencia se emplean clásicamente métodos fenotípicos mediante el uso del método de difusión en agar, así como la búsqueda de determinantes genéticos

concretos en función de la resistencia de interés (Hartantyo et al., 2020) (Rodrigues et al., 2022). La resistencia a los antimicrobianos carbapenémicos son del máximo interés.

## 5. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente

### 5.1 Información general

*Pseudomonas* spp. es un bacilo de entre 1,5 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud, y diámetro de entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , Gram negativo, catalasa y oxidasa positivo, no fermentativo, capaz de colonizar diferentes ambientes debido a su gran capacidad de adaptación y desarrollo de rutas metabólicas (Capatina et al., 2022). Las bacterias no son formadoras de esporas y a pesar de ser aerobias estrictas, pueden metabolizar los nitratos como fuente alternativa de electrones, permitiéndoles crecer en anaerobiosis (Park y Sauer, 2021).

El género *Pseudomonas* abarca a numerosas especies, entre las que destaca *P. aeruginosa*, patógeno oportunista asociado a infecciones en animales y humanos. La proliferación de este microorganismo en ambientes húmedos y su crecimiento a bajas temperaturas, representa un problema a nivel hospitalario y alimentario. De hecho, la transmisión del patógeno puede estar asociada a la contaminación de material quirúrgico y soluciones acuosas incluyendo desinfectantes, jabones, o fluidos de irrigación y diálisis, dada su capacidad de formación de biofilms (Lanini et al., 2011). La bacteria puede presentar distintas variantes morfológicas como consecuencia de respuestas al estrés ambiental, o la adquisición de resistencias antimicrobianas. En los últimos años han surgido nuevas cepas que presentan una gran cantidad de factores de virulencia, asociados a la resistencia a varias familias de antibióticos. La capacidad infectiva no es tan dependiente del genotipo sino de las condiciones del huésped en el momento de la colonización (Valentini et al., 2018), estando asociadas las formas sésiles a infecciones crónicas y las planctónicas a las agudas.

La presencia de *P. aeruginosa* multirresistente en alimentos está asociada a leche cruda, carne o agua, pero el incremento en la prevalencia en alimentos de origen vegetal ha hecho aumentar su relevancia en el contexto de la salud pública. También se incluye dentro de las bacterias recogidas bajo el acrónimo ESKAPE a causa de las multirresistencias.

### 5.2 Factores ambientales de crecimiento

El crecimiento de *Pseudomonas* spp. requiere un valor de actividad de agua superior a 0,95, mientras que valores de pH por debajo de 5,4 producen su inhibición. En relación con la temperatura, algunas especies pueden crecer a temperaturas de refrigeración, siendo de carácter psicrófilo, mientras que otras pueden adaptarse y crecer a temperaturas superiores, de hasta 42 °C (Wu y Li, 2015). *P. aeruginosa* es resistente a altas concentraciones de sal y colorantes, así como a un amplio espectro de antibióticos en concentraciones moderadas. Cabe destacar que *P. aeruginosa* es capaz de desarrollarse en presencia de concentraciones escasas de nutrientes, e incluso en medios como agua destilada (Mena y Gerba, 2009). Estas propiedades confieren al patógeno una mayor capacidad de supervivencia y adaptación en distintos ambientes, principalmente húmedos, promoviendo su naturaleza ubicua y la aparición de infecciones nosocomiales.

### 5.3 Factores de patogenicidad

*P. aeruginosa* presenta varios sistemas de comunicación bacteriana o *quorum sensing*, como *las* y *rhl*, que controlan la producción de distintos factores de virulencia, entre los que se incluyen las elastasas (*lasB* y *lasA*), proteasa alcalina (*aprA*), rhamnolípidos que intervienen en síntesis de biosurfactantes (*rhlAB*), exotoxina A (*exoA*) con actividad ADP-ribosiltransferasa, cianuro de hidrógeno, superóxido dismutasa, etc. (Schaber et al., 2004).

En cuanto a la producción de toxinas, la más importante es la exotoxina A, que inhibe la síntesis proteica en células eucariotas una vez unida al receptor. Además, dicha toxina presenta actividad inmunodepresora (Michalska y Wolf, 2015). La destrucción tisular está promovida por ciertas enzimas como las elastasas que hidrolizan numerosas proteínas del hospedador como la elastina, la laminina, el fibrinógeno, el colágeno, entre otras (van der Plas et al., 2016).

La patogenicidad de *P. aeruginosa* viene dada por el Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) a través del cual se producen varios factores de virulencia en el citoplasma de las células del hospedador (Hausser, 2009). Dicho sistema está modulado por las respuestas ambientales, como la disminución de  $Ca^{2+}$  o el contacto con superficies de células eucariotas.

La capacidad de formación de biofilm constituye en sí misma un factor de virulencia, asociado a la resistencia a antimicrobianos, originando infecciones difíciles de tratar. No obstante, *P. aeruginosa* suele afectar a tejidos dañados en pacientes con un sistema inmunológico debilitado, por lo que raramente se presentan infecciones en individuos sanos.

### 5.4 Síntomas asociados y tratamiento

La aparición de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* ha estado asociada a un mayor impacto en la transmisión de infecciones hospitalarias, siendo su frecuencia alrededor del 8 % (EPINE, 2019). Las resistencias bacterianas a los antipseudomónicos conocidos, incluidos los carbapenémicos con actividad frente a *Pseudomonas* spp. (imipenem, meropenem y doripenem) ha hecho más difícil adecuar un tratamiento dirigido frente a la infección, haciendo que la mortalidad ascienda a tasas de entre el 35 y el 70 %, según la localización de la infección, pronóstico de la enfermedad base, gravedad clínica inicial y tratamiento antibiótico (van Loon et al., 2018). La elevada morbimortalidad se presenta en pacientes inmunodeprimidos, siendo además la causa más frecuente de infección respiratoria crónica en pacientes con fibrosis quística. Las infecciones nosocomiales incluyen generalmente neumonías, bacteriemias, infección de heridas quirúrgicas e infecciones de vías urinarias (Kerr y Snelling, 2009) (Sordé et al., 2011). Los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de *P. aeruginosa* multirresistente están asociados a la edad avanzada, a la ventilación mecánica, la traqueostomía, y el uso previo de carbapenémicos (Cezario et al., 2009). El tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* resistente debe incluir antimicrobianos, seleccionados según el antibiograma. La administración de colistina, la cual genera escasas resistencias cruzadas frente a otros agentes antipseudomónicos, junto con tratamientos combinados de antibióticos (betalactámicos y aminoglucósidos) parecen ser las mejores alternativas para el tratamiento de las infecciones, aunque no existen aún estudios sólidos que avalen una reducción de la mortalidad debida a dichos tratamientos (Peña et al., 2013).

## 5.5 Datos epidemiológicos y de prevalencia

Debido a su amplio reservorio y origen ambiental, *Pseudomonas* spp. puede estar presente en alimentos de origen vegetal, ya que las principales fuentes de contaminación proceden del agua y el suelo (Kominos et al., 1972). De hecho, el género puede comprender hasta un 40 % de la microbiota natural presente en la superficie de frutas y vegetales, causando aproximadamente un 50 % de pérdidas de productos almacenados en refrigeración durante el periodo post-cosecha.

A pesar de que no se considera uno de los principales patógenos alimentarios, existen estudios que reportan información sobre resistencias antimicrobianas de hasta 401 aislados de *Pseudomonas* spp., principalmente *P. aeruginosa*. A través de métodos de microdilución y de concentración mínima inhibitoria, un estudio identificó una tasa de resistencia significativa a los aminoglucósidos en aislado de *Pseudomonas* spp. procedentes de vegetales y ensaladas (Schwaiger et al., 2011). En ese estudio se observó resistencia a los principales antibióticos de origen clínico como gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, colistina, piperacilina, ceftazidima, o cilastatina. A través de los límites establecidos por la escala CLSI (2012) y métodos de difusión en disco, se observó además resistencias a los carbapenémicos en aislados procedentes de lechuga, coliflor, zanahoria, pimiento, pepino y tomate (Allydice-Francis y Brown, 2012). En otro estudio realizado en Portugal se aislaron un total de 35 muestras positivas para *Pseudomonas* spp. multirresistente en lechuga, tomate y zanahoria (Jones-Días et al., 2016). Aparentemente, la contaminación por *P. aeruginosa* en alimentos procesados de origen vegetal procede de la materia prima en mayor medida que durante la elaboración, como demostraron Wright et al. (1976) donde aislaron un 44 % de muestras positivas para *P. aeruginosa* en ensaladas servidas en la cocina de un hospital. De igual forma, Correa et al. (1991) obtuvieron un total de 38 y 98 aislados procedentes de muestras de ensaladas y muestras clínicas, respectivamente, en un hospital de Brasil, y más de un 50 % de las muestras presentaron recuentos superiores a 100 UFC/g. En un estudio más reciente (Ruiz-Roldán et al., 2021) se obtuvo una prevalencia de un 53,1 % de muestras positivas para *Pseudomonas* spp. en vegetales crudos, clasificándose en 139 pulsotipos. A partir de los aislados, se recuperaron un total de 37 cepas de *P. aeruginosa*, distinguiéndose un total de 28 secuencias y 9 serotipos. Los autores demostraron que los aislados presentaron, en mayor parte, rasgos asociados a factores de virulencia, por lo que su patogenicidad se considera altamente relevante.

## 5.6 Metodologías para la detección

La rápida y correcta identificación de *P. aeruginosa* es crítica en muestras de origen clínico, de forma que puedan desarrollarse los tratamientos más adecuados para la prevención y erradicación de la infección. Su identificación en el laboratorio y la determinación de su sensibilidad a los antimicrobianos no suelen plantear dificultades, con la excepción de los fenotipos mucosos que suelen identificarse en pacientes con fibrosis quística. De acuerdo con la legislación comunitaria y las directrices del *Codex Alimentarius*, *P. aeruginosa* debe estar ausente en muestras de agua y alimentos (Tang et al., 2017). Para la detección es necesario poner a punto métodos que determinen la presencia de células en medios planctónicos, así como en forma de biofilms. Además de los métodos tradicionales de enumeración y detección, se han desarrollado métodos de detección y

confirmación molecular, inmunológicos, ópticos y electroquímicos, a través de la presencia directa o indirecta de *P. aeruginosa* a través de metabolitos o moléculas de señalización.

Las técnicas dependientes de cultivo, entre las que se encuentra el método ISO para la detección y enumeración de *P. aeruginosa* en aguas (ISO, 2008), incluyen la utilización de agares selectivos para aislamiento de *Pseudomonas* spp. con triclosán (PIA) o cetrimidá (PCN). La producción de piocianina se suele determinar en diversos agares cromogénicos, pero presentan el inconveniente de la baja selectividad, ya que solo el 90-95 % de las especies de *P. aeruginosa* lo producen (Weiser et al., 2014). Las temperaturas de incubación varían en función de la sensibilidad y selectividad del medio utilizado, siendo superior a 42 °C, mientras que para otros medios cromogénicos los resultados son más fiables a 37 °C. Habitualmente los periodos de incubación oscilan entre 2-5 días en condiciones de aerobiosis. Sin embargo, las células formadoras de biofilm en capas profundas requieren condiciones de anaerobiosis, siendo en muchas ocasiones no detectadas por estos medios de cultivo (Thi et al., 2020).

Las técnicas moleculares, a pesar de su alto coste, presentan una mayor fiabilidad para la detección de *P. aeruginosa*. Estas incluyen los métodos por PCR (RT-qPCR y M-CPR), que son capaces de detectar secuencias de ADN, así como el 16S rARN, y genes asociados (*oprI*, *oprL*, *algD*, *gyrB*, *ecfX*, *fliC*, *toxA*, *rrl*, *rrs* y *ETA*) (Thi et al., 2020). En los últimos años se han desarrollado métodos de amplificación isoterma como la reacción en espiral de la polimerasa (PSR) o el método LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*), que presenta un menor coste de reactivos y equipamiento (Zhang et al., 2013) a pesar de su complejo diseño e interpretación de los resultados.

Las técnicas de inmunoensayo incluyen la detección selectiva de la unión antígeno-anticuerpo, y habitualmente presentan una alta sensibilidad y bajo coste. Se han utilizado diversas moléculas que actúan como antígeno para la detección de *P. aeruginosa* tales como la exotoxina A, elastasa, y proteasa alcalina, así como la proteína F (OprF) y el antígeno comercial St-Ag:1-17. Entre las principales técnicas de inmunoensayo destacan los ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos inmunocromatográficos (ICA), métodos de inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis o inmunoblot, entre otros (Tang et al., 2017).

La detección de células de *P. aeruginosa*, así como de otros patógenos, está siendo optimizada a través del desarrollo de biosensores ópticos, electroquímicos o piezoeléctricos. Estos biosensores son dispositivos analíticos que incorporan un material biológico y/o biomoléculas (tejidos, microorganismos, organelos celulares, enzimas, anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos, proteínas, aptámeros, compuestos biomiméticos, catalizadores sintéticos, biomoléculas conjugadas y polímeros impresos, entre otros) asociados o integrados en un transductor fisicoquímico o sistema de transducción (Lazcka et al., 2007). La puesta a punto de biosensores electroquímicos se antoja la opción más viable para el diseño de dispositivos *Point of Care* (POC) que puedan monitorizar la presencia de *P. aeruginosa* en muestras de origen alimentario y ambiental (Ciui et al., 2017).

## 6. *Bacillus cereus*

### 6.1 Información general

*B. cereus* es un microorganismo esporulado Gram positivo que pertenece al género *Bacillus* y que

se ha clasificado como un grupo independiente. Este grupo (*B. cereus sensu lato*) está integrado por ocho especies reconocidas formalmente: *B. cereus sensu stricto* (o simplemente *B. cereus*), *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* y *B. toyonensis* (Oren y Garrity, 2014). Algunas especies de este grupo pueden causar enfermedades alimentarias o clínicas, mientras que otros no parecen ser patógenos. *B. cereus sensu stricto* se relaciona con toxiinfecciones alimentarias y es un importante contaminante de alimentos por su amplia y frecuente distribución en la naturaleza y en la cadena alimentaria.

## 6.2 Prevalencia

*B. cereus* está ampliamente distribuido en la naturaleza, por lo que se puede identificar en todo tipo de alimentos. El aumento, en los últimos años, de la producción y uso de harinas de distintos cereales y de insectos, para su incorporación a alimentos, hace necesario evaluar los riesgos biológicos que pueden estar presentes.

Diferentes estudios han evidenciado su presencia en distintos tipos de harinas. En relación a las de insecto, por ejemplo, Grabowski y Klein (2017) identificaron *B. cereus* en insectos desecados o en polvo, con recuentos de *Bacillus* spp. en torno a  $3,0 \log_{10}$  UFC/g. En un estudio en mosca soldado, que presenta gran interés por su valor nutritivo, *B. cereus* se identificó, junto a otros patógenos alimentarios (Raimondi et al., 2020). Se alcanzaron recuentos de *Bacillus* spp. de  $2,3-3,2 \log_{10}$  UFC/g. En otra investigación en el mismo insecto se identificaron los patógenos alimentarios *Salmonella* y *B. cereus* en muestras de larvas y/o residuos (Wynants et al., 2019)

También Walia et al. (2018) realizaron una evaluación de riesgos cualitativa de polvo de grillo, en el que *B. cereus* se consideró como uno de los posibles riesgos biológicos.

Tratamientos como la fermentación láctica o el uso de compuestos como nitrito sódico y lactato sódico en las muestras del gusano de la harina procesadas con ellos dieron lugar a que *Bacillus cereus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* estuvieran por debajo del límite de detección (Borremans et al., 2020).

En general, los estudios coinciden en recomendar que, dado que existe el riesgo de contaminación por *B. cereus* en estos productos, se aplique un tratamiento adecuado de descontaminación (por calor u otra tecnología) para garantizar la inocuidad de harinas de insecto antes de su incorporación a alimentos para consumo humano.

## 6.3 Brotes asociados

En 2019 se detectaron un total de 155 brotes de toxiinfección causados por este agente en Europa, de los que 7 personas afectadas fallecieron (EFSA/ECDC, 2021a). Un total de 10 países europeos notificaron brotes, entre los que se encontraba España. Cabe resaltar el importante aumento en la tasa de mortalidad respecto al año anterior (de 1 a 7 personas, respectivamente).

En el RASFF (*Rapid Alert System Feed and Food*) se han notificado numerosas alertas por *B. cereus* en distintos productos en los últimos años. Entre ellos se encontraban barritas elaboradas con proteína de insectos, escorpiones cocinados, una bebida de avena (con 29 personas con sintomatología), semillas de sésamo, polvo de hierba de cebada y diferentes especias.

## 6.4 Síntomas asociados

Se han descrito brotes asociados a distintos tipos de harina, lo que es especialmente preocupante cuando se destinan a alimentación infantil. Dada la pequeña proporción de alimentos que incorporan harinas de insectos, no se ha descrito aún ningún brote de toxiinfección por *B. cereus* asociado a su consumo. La sintomatología esperable sería la misma que la de los brotes asociados a otros alimentos.

## 6.5 Metodologías para la detección

Los métodos clásicos incluyen crecimiento en medios selectivos (manitol, yema de huevo y polimi-xina, MYP; y agar suplementado con NaCl y glicina, NGKG), tinciones de Gram y tests de esporula-ción, y métodos bioquímicos (galerías tipo API).

Los métodos moleculares incluyen PCR, qPCR y RT-qPCR para el tipado molecular de los miem-bros del grupo, basados en las regiones variables 16S y 23S del rRNA (Oliwa-Stasiak et al., 2010). Los resultados muestran que hay un elevado grado de homología en las secuencias entre las ce-pas, por lo que los métodos no han permitido una diferenciación exacta entre las diferentes espe-cies de *B. cereus* incluidas en el grupo (EFSA, 2016). También existen diferentes técnicas para la identificación de las enterotoxinas producidas por *B. cereus*.

La diferenciación entre *B. cereus sensu stricto* y *B. thuringiensis* se basa en aspectos fenotípicos microscópicos que no son siempre concluyentes, por lo que la única forma de reconocer si una cepa pertenece a la especie. *B. thuringiensis* es identificarla mediante WGS (EFSA, 2016) y puede suponer una limitación para la detección inequívoca de *B. cereus sensu stricto* en alimentos.

## 7. *Cronobacter* spp.

### 7.1 Información general

El género *Cronobacter* spp. es un patógeno emergente y su estudio presenta un interés creciente. En 2002, la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002) definió a *Cronobacter* spp. como “riesgo severo para una población restringida, que repre-senta una amenaza de muerte o secuelas crónicas de larga duración”.

Se ha prestado considerable atención a las infecciones por *Cronobacter* spp. de los recién na-cidos. A partir de 1961, *Cronobacter* spp. se notificó por primera vez en bebés hospitalizados en el Reino Unido; en 1979, se notificaron casos de bacteriemia por *Cronobacter* spp. entre recién nacidos en Macon (Estados Unidos) y en años posteriores se notificaron más infecciones por *Cro-nobacter* spp. en los Países Bajos (1983, 1987), Grecia (1987), Islandia (1989) y los Estados Unidos (1989 y 2001). En 2001, un grupo de investigadores, en relación con el estudio de infecciones por *Cronobacter* spp., permitió que el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos realizara una investigación de rastreo que identificó la Fórmula Infantil en Polvo (FIP) contaminada como una fuente importante de infecciones infantiles (Strysko et al., 2020).

A pesar de la atención prestada a los casos infantiles, *Cronobacter* spp. también puede infectar a personas de todas las edades. Las infecciones por *Cronobacter* spp. en adultos provocan síntomas gastrointestinales leves, diarrea e infecciones del tracto urinario. Los ancianos (Alsonosi et al., 2015) y los adultos inmunocomprometidos son los más susceptibles a estos agentes.

La OMS recomienda la leche materna como el mejor alimento para los lactantes y son reconocidos sus prometedores beneficios para la salud (Boué et al., 2015) (OMS, 2022). Sin embargo, los lactantes y recién nacidos que no pueden ser amamantados por razones inevitables son alimentados con FIP reconstituida que se considera una alternativa equivalente a la leche materna (Barron y Forsythe, 2007) (Kent et al., 2015). En este sentido, la calidad y la seguridad de las FIP presentan un desafío importante para los fabricantes de alimentos y deben satisfacer los criterios microbiológicos internacionales del “Código de prácticas de higiene para fórmulas en polvo para lactantes y niños pequeños (CAC/RCP 66-2008)”. Aunque la FIP es un producto deshidratado con una actividad de agua reducida, siendo un medio desfavorable para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, todavía hay varios casos en los que se ha informado que la PIF reconstituida contaminada está implicada en diversas infecciones de *Cronobacter sakazakii* en bebés y recién nacidos (Lepuschitz et al., 2019) (Elkhawaga et al., 2020).

Como se ha comentado anteriormente, la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002) ha descrito a *C. sakazakii* (hoy en día género *Cronobacter*) como un “peligro grave para poblaciones restringidas, potencialmente mortal o con secuelas crónicas sustanciales de larga duración”. El agente se vincula especialmente con FIP y lactantes y recién nacidos. Debido a la gravedad de las infecciones causadas por *C. sakazakii*, es fundamental desarrollar medidas de control rigurosas para reducir los riesgos de contaminación en cada paso durante la producción de PIF reconstituidas siguiendo las pautas y recomendaciones establecidas por las autoridades competentes en seguridad alimentaria (Lehner et al., 2018).

En el Reglamento de Criterios Microbiológicos de la Unión Europea (Reglamento N° 2073/2005) se incluye *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) como sujeto a Criterio de Seguridad Alimentaria en “Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes de menos de 6 meses” con un Plan de Muestreo de  $n=30$ ,  $c=0$ , límites  $m$  y  $M$  de ausencia en 10 g y con el método analítico de referencia (ISO, 2017a).

## 7.2 Características generales e impacto

*Cronobacter* spp. es un género de bacterias Gram negativas que forma parte de las enterobacterias, encontrándose de forma natural en la naturaleza (suelo, agua, vegetales y animales), aunque en muchos casos se desconoce el reservorio.

Su capacidad para formar biofilms y su resistencia a la desecación, en comparación con otras enterobacterias, hace que sobreviva durante largos periodos de tiempo (hasta 2 años) en ambientes secos, como la leche en polvo y su entorno de producción. Una vez que los preparados se reconstituyen, *Cronobacter* spp. se multiplica dependiendo de las condiciones de preparación y almacenamiento.

*Cronobacter* spp. (anteriormente *E. sakazakii*) es un grupo importante de patógenos oportunistas emergentes transmitidos por los alimentos. Las infecciones graves por *Cronobacter* spp. en lactantes pueden provocar enterocolitis necrosante, bacteriemia (septicemia) y meningitis, con complicaciones a largo plazo para quienes sobreviven, como retraso en el desarrollo neurológico, hidrocefalia y daño neurológico permanente (Holý y Forsythe, 2014). Los lactantes con bajo peso al nacer o inmunocom-

prometidos tienen un riesgo particular de contraer infecciones causadas por este patógeno (Hunter y Bean, 2013). Además, la tasa de mortalidad de la meningitis relacionada con *Cronobacter* spp. puede ser de hasta 40 a 80 % (Friedemann, 2009). Sin embargo, la epidemiología y tasas de infección por *Cronobacter* spp. no siempre están totalmente clarificadas y, por lo general, solo se notifican anualmente de 4 a 6 casos de dichas infecciones en bebés a los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, 2022). La mayoría de las infecciones por *Cronobacter* spp. se producen en la población adulta, especialmente en personas inmunocomprometidas, ancianos y en aquellos con implantes médicos, visitas prolongadas al hospital o enfermedades agudas, crónicas o graves (Patrick et al., 2014) (Alsonosi et al., 2015).

El género bacteriano *Cronobacter* se conocía anteriormente como *E. sakazakii* y se definió por primera vez como un nuevo género en 2007 (Iversen et al., 2007). Es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* y está estrechamente relacionado con los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*. En los últimos años, el género *Cronobacter* ha sido objeto de una serie de revisiones y actualmente hay autores que consideran que contiene 10 especies (Joseph et al., 2012) (Brady et al., 2013). Las siguientes fueron las especies formalmente reconocidas: *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis*, *C. turicensis*, *C. condimenti*, *C. malonaticus*, *C. helveticus*, *C. pulveris* y *C. zurichensis*, incluidas las antiguas especies descritas *E. sakazakii*, *E. helveticus*, *E. pulveris* y *E. turicensis* (Holý y Forsythe, 2014), lo que dificulta determinar las especies concretas de *Cronobacter* spp. que se notificaron antes de las publicaciones científicas de 2007. Holý y Forsythe (2014) clasificaron *Cronobacter* spp. en dos grupos principales: el Grupo 1, que comprende *C. sakazakii* y *C. malonaticus*, que provienen principalmente de muestras clínicas, y el Grupo 2, que comprende *C. turicensis* y *C. universalis* con una menor frecuencia notificada. *Cronobacter* spp. son bacterias ubicuas según lo descrito por Cawthorn et al. (2008) y El-Sharoud et al. (2009) debido a que el patógeno ha sido aislado de muestras clínicas, alimentos (FIP, alimentos listos para el consumo), bebidas, agua, carne, verduras e incluso queso (Beuchat et al., 2009) (El-Sharoud et al., 2009). La incidencia de *Cronobacter* spp. en estas matrices alimentarias y la posible contaminación doméstica aumentan los riesgos potenciales de infecciones en adultos inmunocomprometidos, tal como afirman Baumgartner et al. (2009). La fórmula FIP es, hasta ahora, la única fuente de alimento que ha sido claramente vinculada epidemiológicamente a brotes causados por *Cronobacter* spp. En los países desarrollados, gran parte de la investigación sobre *Cronobacter* spp. se ha centrado en la posible presencia de estos patógenos en las materias primas de FIP (El-Sharoud et al., 2009), las instalaciones de procesado (Mullane et al., 2007) (Proudy et al., 2008) y los productos finales (Mullane et al., 2008).

Sin embargo, muchos estudios taxonómicos señalan únicamente 7 especies diferentes bajo el género *Cronobacter* (anteriormente *E. sakazakii*), a saber, *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* y *C. condimenti* (Iversen et al., 2007, 2008) (Joseph et al., 2012) (Stephan et al., 2014). Siendo *C. sakazakii* el aislamiento clínico más frecuente del género *Cronobacter* spp. entre todos los grupos de edad, perteneciendo al considerado Grupo 1 (Forsythe, 2018). Junto con *C. malonaticus* y *C. turicensis*, también se la conoce como la especie más patógena que causa meningitis, sepsis y enterocolitis necrosante (ECN) en recién nacidos y lactantes (Patrick et al., 2014) (Alsonosi et al., 2015) (Finkelstein et al., 2019).

Un trabajo muy interesante es el realizado por Odeyemi y Sani (2019) en Malasia. Consideran que hay estudios muy limitados de este patógeno en dicha parte del mundo. Por lo tanto, los estudios sobre la incidencia, virulencia y resistencia a los antibióticos de *Cronobacter* spp. son imperativos. Este estudio tuvo como objetivo investigar la resistencia a los antibióticos, los presuntos factores de virulencia y la morfología de colonias multicelulares entre *C. sakazakii* aislado previamente en Malasia y comparado con cepas de referencia.

Este estudio tuvo como objetivo investigar los presuntos factores de virulencia a nivel fenotípico y la resistencia a antibióticos en *C. sakazakii* aislado de FIP y otras fuentes. Se utilizaron 9 cultivos (denominados CR1-9) cuya procedencia era de la colección de cultivos de los investigadores (*C. sakazakii*), y 3 especies de *Cronobacter* de colección: *C. sakazakii* ATCC® 29544™, *C. muytjensii* ATCC® 51329™, *C. turicensis* E866. Los aislados se sometieron a susceptibilidad a los antibióticos y a los siguientes factores de virulencia: proteasa, ADNasa, hemolisina, gelatinasa, motilidad y formación de biofilms, utilizando métodos fenotípicos. Todas las bacterias fueron capaces de formar biofilm en agar a 37 °C y fueron resistentes a ampicilina, eritromicina, fosfomicina y sulfametoxazol. Se observó, en este estudio, que las cepas probadas formaron un biofilm débil y, en ocasiones, fuerte, con morfotipos de colonia violeta seca y áspera (rdar), marrón seca y áspera (bdar), mucoide roja y lisa (rmas) en agar rojo Congo. rdar expresa *curli* (fibrillas amiloides) y *fimbriae*, mientras que bdar expresa *curli*. Ambos morfotipos de colonias formadoras de biofilm se encuentran comúnmente en *Enterobacteriaceae*, incluidas diversas cepas de *Salmonella* spp. Este estudio también revela nuevos morfotipos de colonias en especies de *Cronobacter* spp. En conclusión, hubo una correlación entre los presuntos factores de virulencia y la resistencia a los antibióticos entre las bacterias analizadas. Por lo tanto, se recomienda realizar más estudios sobre los genes de virulencia y resistencia a los antibióticos.

En 2004, Iversen et al. (2004) informaron sobre la capacidad de *Cronobacter* spp. para formar biofilms en varias superficies como vidrio, acero inoxidable, silicona, látex y policarbonato. Se observó que la unión de las células aparece rápidamente con respecto al plástico (un material hidrofóbico) y a los materiales hidrofílicos (Lehner et al., 2006). La disponibilidad de nutrientes y la temperatura del medio de crecimiento son factores importantes que influyen en la formación de biofilms (Kim et al., 2006). Se informó que más del 75 % de *Cronobacter* spp. produjo biofilm con leche infantil de fórmula, mientras que menos del 20 % produjo biofilm utilizando caldo de triptona de soja (TSB) diluido, cuando ambos se usaron como medio de cultivo (Oh et al., 2007). Más aún, la temperatura influye en la formación de biofilms. Kim et al. (2006) informaron que *Cronobacter* spp. no formaba biofilms a 12 °C en ninguno de los medios de crecimiento que se estudiaron. Según un estudio de Strydom et al. (2012), compuestos tales como D-galactosa, heteropolisacárido, D-glucosa, ácido glucurónico, D-fucosa y D-manosa incrementan la formación de biofilms de *Cronobacter* spp. (Strydom et al., 2012). Además, estos compuestos ayudan a incrementar la resistencia de estas bacterias a los antibióticos, detergentes y otras situaciones disgenésicas ambientales. Kim et al. (2007) informaron que la mayoría de los desinfectantes utilizados en las cocinas de establecimientos dedicados al servicio de alimentos, así como de hospitales y guarderías, no siempre son lo suficientemente efectivos para eliminar las células bacterianas atrapadas dentro de estas matrices orgánicas, por

lo tanto, la formación de biofilms en los equipos y en los entornos hospitalarios aumenta el riesgo de infecciones en bebés y niños, así como en adultos inmunocomprometidos. Se ha observado, en algún estudio, la formación de biofilms en la leche de fórmula infantil después de 24 horas en sondas de alimentación enteral, lo que aumenta el riesgo de infección neonatal, ya que este tipo de sondas pueden permanecer *in situ* durante varios días a temperatura corporal normal mientras se administran nutrientes a los lactantes en intervalos de 2 o 3 horas (Hurrell et al., 2009).

### 7.3 Datos epidemiológicos y prevalencia en alimentos

Las infecciones por *Cronobacter* spp. en lactantes se han relacionado epidemiológicamente con FIP contaminadas; al analizar un gran número de muestras de FIP para constatar la presencia de *Cronobacter* spp., se ha confirmado la existencia ocasional de este contaminante (Norberg et al., 2012) (Pei et al., 2016). Por lo tanto, la vigilancia de las FIP para detectar la presencia de *Cronobacter* spp. se ha convertido en una rutina para los fabricantes y los servicios de control alimentario. Como las fórmulas infantiles son productos que durante el proceso de elaboración sufren una pasteurización y *Cronobacter* spp. no puede sobrevivir a este tratamiento térmico (Iversen et al., 2004), la contaminación observada en los productos finales de FIP sugiere que las bacterias probablemente proceden del entorno de la fábrica o bien de micronutrientes sensibles al calor agregados después de la pasteurización. Además, la aparición de infecciones en individuos que no consumieron ni manipularon FIP, sugiere que el patógeno puede proceder del medio ambiente o de alimentos distintos al FIP (Patrick et al., 2014) (Alsonosi et al., 2015). De hecho, se han realizado investigaciones sobre la presencia de especies de *Cronobacter* spp. en alimentos deshidratados pulverulentos que no son preparados para lactantes, como material vegetal y otras fuentes deshidratadas (Sani y Odeyemi, 2015). Además, las FIP también pueden contaminarse en el entorno doméstico o en cualquier otro lugar después de abrir el recipiente. En varias investigaciones de brotes o casos de infección por *Cronobacter* spp. en bebés prematuros y recién nacidos, el microorganismo se aisló de licuadoras, cepillos para limpiar biberones y envases abiertos de FIP (Kandhai et al., 2004) (Friedemann, 2009).

*Cronobacter* spp. se puede aislar de una amplia gama de alimentos y entornos. Las investigaciones de *Cronobacter* spp. aislado de los alimentos han incluido, además de estudios sobre FIP o deshidratadas (Norberg et al., 2012) (Gicova et al., 2014), también otros en harina (Cetinkaya et al., 2013), alimentos secos en polvo, cereales, productos de cereales (Brandao et al., 2017), especias (Li et al., 2017), hierbas (Jaradat et al., 2009) (Garbowska et al., 2015), verduras (Chen et al., 2016) (Berthold-Pluta et al., 2017), alimentos listos para el consumo (Vasconcellos et al., 2018), y diversos alimentos de origen animal (Sani y Odeyemi, 2015). También se han realizado muestreos ambientales como ya se ha indicado anteriormente en el entorno de producción de FIP (Sani y Odeyemi, 2015), el entorno doméstico (Jaradat et al., 2009) y las granjas (Vojkowska et al., 2016); confirmando la distribución ubicua del microorganismo y que la mayoría de los aislados de *Cronobacter* spp. en todo el mundo se originan de fuentes vegetales (Chen et al., 2016). Sin embargo, las características ecológicas de dicho agente microbiano son poco conocidas y se precisan estudios amplios y en profundidad de los hábitats de *Cronobacter* spp. para identificar la aparición y las características de estos patógenos presentes en las diversas categorías de alimentos y los diversos entornos en los que pueden identificarse.

Varios estudios han demostrado que la mayoría de los aislamientos de *Cronobacter* spp. en todo el mundo se originan a partir de fuentes vegetales (Sani y Odeyemi, 2015) (Chen et al., 2016). También se ha informado que un número relativamente alto de cereales dan positivo para *Cronobacter* spp. (Friedemann, 2007) (Brandao et al., 2017). El trigo y el arroz son alimentos básicos de gran importancia mundial, considerándose el arroz un alimento primordial en la dieta de una gran parte de la población mundial. Lou et al. (2019) estudiaron, en China continental, la presencia de *Cronobacter* spp. en muestras de arroz, trigo y sus productos derivados, así como en sus entornos relacionados con el cultivo, el procesado y el consumo. El objetivo último del estudio fue identificar y determinar las posibles vías de contaminación y comprender cómo minimizar o erradicar dicha contaminación. En dicho estudio se investigó la incidencia y distribución de *Cronobacter* en 1245 muestras de cereales y ambientes relacionados. El 39,1 % (101/258) de las muestras relacionadas con el arroz y el 46,9 % (98/209) de las muestras relacionadas con el trigo dieron positivo para dicho microorganismo, y la tasa positiva difirió notablemente según el método de procesado. *Cronobacter* se encontró en plantas de arroz y trigo en las etapas de macollamiento, llenado y madurez. Se analizaron muestras de suelo, agua e hisopos de plantas de molinera cercanas y los resultados revelaron que el 6,3 % (7/122) del agua de los arrozales, el 49,1 % (28/57) y el 62,1 % (41/67) de las muestras de hisopos del arroz y las plantas de molinera de harina de trigo fueron positivas para *Cronobacter* spp. La subtipificación de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) indicó que algunas cepas tenían un perfil común, lo que sugería su persistencia en el medio ambiente, posibles rutas de transmisión y contaminación cruzada en el procesado. Finalmente, se realizó un muestreo a 18 familias para evaluar los riesgos potenciales y se observó que ninguna de las familias que comieron, principalmente, arroz cocido en agua, dio positivo por *Cronobacter* spp., sin embargo, el 66,7 % de las familias (6/9) cuyos alimentos básicos se produjeron a partir de harina de trigo sí dieron positivo.

Hoy en día, las medidas biológicas para el control de los patógenos transmitidos por los alimentos son cada vez más atractivas debido a la aparición de resistencias a los antimicrobianos y a la concienciación de los consumidores sobre los problemas de salud relacionados con los aditivos y conservantes químicos de los alimentos (Balciunas et al., 2013) (Oliveira et al., 2018). El uso de agentes bioprotectores como compuestos derivados de plantas, probióticos, bacteriófagos y/o sus metabolitos que exhiben efectos antagónicos son algunos de los enfoques investigados contra *C. sakazakii* hasta el momento. Así como en los últimos años han aparecido numerosas revisiones dirigidas a los enfoques fisicoquímicos para la inactivación de *C. sakazakii* (Pina-Pérez et al., 2016) (Hu et al., 2018) (Henry y Fouladkhah, 2019), los métodos biológicos no se han discutido exhaustivamente hasta ahora.

## 7.4 Metodología

Varios métodos para el aislamiento e identificación de *Cronobacter* spp. en los alimentos se han estandarizado. Las metodologías más conocidas para el aislamiento de *Cronobacter* spp. se referencian en el Manual de Análisis Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (BAM-FDA) (Chen et al., 2012) y en la norma ISO 22964:2017 (Organización Internacional de Normalización) (ISO, 2017a). Ambos utilizan una etapa de preenriquecimiento y medios de cultivo cromogénicos.

Además, se han encontrado varios métodos analíticos para la identificación del género *Cronobacter* spp. con una buena precisión, incluidos kits comerciales, PCR, *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que es bastante eficiente tanto para la identificación como para la tipificación microbiana, y, más recientemente, el espectrómetro de masas con fuente MALDI y analizador de tiempo de vuelo (TOF), conocido como MALDI-TOF/MS (Joseph et al., 2012) (Forsythe et al., 2014). Sin embargo, la investigación con MALDI-TOF/MS y *Cronobacter* spp. es todavía algo escasa en la literatura. La PFGE permite la tipificación.

## 7.5 Pasos futuros

Son necesarios estudios ecológicos amplios y en profundidad de los hábitats de *Cronobacter* spp. para identificar la aparición y las características de estos patógenos presentes en las diversas categorías de alimentos y diversos entornos alimentarios en los que pueden encontrarse y, además, se requieren muestreos lo suficientemente representativos.

El presente patógeno emergente está muy estudiado (dada la especial importancia de esa población de riesgo) en FIP y en el ambiente de sus fábricas de procesado, pero también conviene prestar importancia a otros productos como los cereales.

Hay técnicas utilizables, contrastables y de referencia de organismos de reconocido prestigio, como en el *Bacteriological Analytical Manual* (BAM-FDA) de Estados Unidos (Chen et al., 2012) o la norma ISO 22964:2017 (ISO, 2017a). Ahora bien, también se están investigando técnicas prometedoras tales como el MALDI-TOF/MS.

Hay un buen número de enfoques fisicoquímicos y técnicas de procesado de alimentos basadas en dichos enfoques para la inactivación y destrucción de *Cronobacter* spp. en alimentos. Sin embargo, hay que profundizar en el estudio de agentes bioprotectores como pueden ser los derivados de plantas, probióticos, bacteriófagos y/o sus metabolitos que provocan un efecto antagónico en el microorganismo.

## 8. *Campylobacter* spp.

### 8.1 Generalidades

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Campylobacter*. Dichas bacterias son bacilos Gram negativos, con forma de "espiral", que crecen con poco oxígeno y que presentan su crecimiento óptimo a 42-43 °C (AESAN, 2022a). El género *Campylobacter* comprende 17 especies y 6 subespecies, de las cuales las detectadas con más frecuencia en enfermedades humanas son *C. jejuni* (subespecie *jejuni*) (80 %) y *C. coli* (10 %). En el ser humano, la campilobacteriosis cursa con enterocolitis aguda que se manifiesta con malestar, fiebre, dolores abdominales severos, dolor de cabeza, náuseas y/o vómitos y diarrea acuosa o sanguinolenta. El periodo de incubación oscila entre 1 y 11 días (normalmente de 1-3 días). En la mayoría de los casos, la diarrea tiende a remitir por sí misma. Las bacteriemias ocurren en <1 % de los pacientes con enteritis, pudiéndose producir también secuelas que cursan como desórdenes reumatoides o neuropatías periféricas como la parálisis neuromuscular del síndrome de Guillain-Barré (AESAN, 2012a). En las zonas de bajos recursos, las infecciones por *Campylobacter* son comunes

en los niños pequeños (causando diarrea acuosa en lugar de la diarrea sanguinolenta que se produce en los países de altos recursos) y se asocian a muchas muertes, así como a un retraso en el crecimiento y a deficiencias físicas y cognitivas de por vida (Corcionivoschi y Gundogdu, 2021). Además, como ha destacado la OMS, *C. jejuni* es un patógeno resistente a múltiples antibióticos y se necesitan urgentemente nuevas terapias (OMS, 2020).

La campilobacteriosis es la infección gastrointestinal transmitida por los alimentos más comúnmente notificada en los seres humanos en la Unión Europea desde 2005. En 2020, la notificación de campilobacteriosis registró el número más bajo de casos desde que comenzó la vigilancia de la campilobacteriosis en 2007, debido a los impactos de la retirada del Reino Unido de la Unión Europea y la pandemia COVID-19. En 2020, el número de casos confirmados en la Unión Europea ascendió a 120 946 (tasa de notificación de 40,3 por cada 100 000 habitantes). En total, se notificaron 317 brotes causados por alimentos contaminados con *Campylobacter* spp. a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), incluyendo 1319 casos de enfermedad, 112 hospitalizaciones y ninguna muerte (EFSA/ECDC, 2021b).

La notificación de la campilobacteriosis es obligatoria en 22 Estados miembros de la Unión Europea. En 5 Estados miembros, la notificación se basa en un sistema voluntario (Bélgica, Francia, Grecia, Italia y Países Bajos). En España, la campilobacteriosis es una enfermedad de declaración obligatoria (EDO), tal y como establece el Real Decreto 2210/1995, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (BOE, 1995). Las comunidades autónomas deben comunicar de forma individualizada los casos confirmados.

## 8.2 Transmisión

El principal reservorio de *Campylobacter* spp. son las aves, además del ganado bovino, ovino, porcino, roedores, perros y gatos, así como otros mamíferos y aves silvestres. El espectro de reservorios varía con la especie: *C. jejuni* se encuentra muy difundido, mientras *C. coli* se aísla más frecuentemente de los cerdos. La adquisición primaria de *Campylobacter* spp. por los animales acontece tras el nacimiento y aunque puede ser causa de morbi-mortalidad en estos animales, en la mayoría de las ocasiones, la colonización conduce a un estado permanente de portador.

En el año 2019, la AESAN recopiló un total de 1951 resultados de análisis en alimentos, correspondientes a 2018, en los que se detectó la presencia de *Campylobacter* spp. en 512 muestras, lo que representaba un 26,24 % de muestras positivas con respecto al total. En 2020 el porcentaje de positivos llegó hasta el 44,04 %, lo cual supone un fuerte incremento con respecto a los datos previos (AESAN, 2022a).

La contaminación de los alimentos por *Campylobacter* spp. en la Unión Europea se vigila de acuerdo con el capítulo II (“Vigilancia de zoonosis y agentes zoonóticos”) de la Directiva sobre zoonosis 2003/99/CE (UE, 2003). La forma más frecuente de transmisión de esta zoonosis al ser humano es a través de la carne de pollo poco cocinada, o alimentos listos para el consumo (RTE de sus siglas en inglés *ready-to-eat*) que han estado en contacto con pollo crudo. En sus evaluaciones, la EFSA ha comprobado que los pollos y la carne de pollo pueden representar directamente entre el 20 y el 30 % de los casos en los humanos (EFSA/ECDC, 2021b). Dentro de los RTE, el alimento más

frecuentemente contaminado con *Campylobacter* spp. fue la leche cruda, confirmando la tendencia de 1 de cada 100 notificados durante el periodo 2016-2019. Además, los datos mostraron resultados positivos para la carne y productos cárnicos, seguido de frutas, verduras y zumos.

### 8.3 Epidemiología y resistencia a los antibióticos

En los últimos años, las investigaciones orientadas a comprender mejor la patogenicidad y la fisiología de *Campylobacter* spp. han crecido de forma significativa. Además, varios estudios de investigación se centran en modelos de infección y/o aspectos inmunológicos de la infección por *C. jejuni* (Corcionivoschi y Gundogdu, 2021).

En relación con los estudios en el entorno de las granjas y mataderos, en un estudio reciente realizado en un matadero de la Comunidad Valenciana, para evaluar la epidemiología y la resistencia de *C. jejuni* a los antimicrobianos en el procesamiento de cerdos, los resultados mostraron que todos los lotes llegaron al matadero existiendo *Campylobacter* spp. en las heces, y permanecieron positivos durante el procesado y sacrificio (42,8 %), incluso justo antes de la entrega al consumidor. Además, el 96,3 % de los aislados de *C. jejuni* (la principal especie implicada en la infección humana de origen alimentario) eran cepas multirresistentes a los antibióticos (Marin et al., 2021).

En otro estudio transversal realizado entre los años 2014-2016 en 301 rebaños de rumiantes del País Vasco para estimar la prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli*, e investigar su susceptibilidad a los antimicrobianos, se comprobó que el riesgo de excreción de *C. jejuni* fue mayor en el ganado bovino que en el ovino (81,2 % frente al 45,2 %), mientras que el riesgo de excreción de *C. coli* fue mayor en el ganado ovino que en el bovino (19,1 % frente al 11,3 %) (Ocejo et al., 2019). *C. coli* mostró una mayor resistencia (94,1 %, 32/34) que *C. jejuni* (65,1 %, 71/109), y la resistencia estaba más extendida en los aislados de ganado vacuno lechero que en los de ganado vacuno de carne u ovino. En comparación con los resultados obtenidos 10 años antes (2003-2005) en un estudio similar (Oporto et al., 2007), se observó un aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas en *C. jejuni* procedentes de ganado vacuno de carne (32,0 a 61,9 %), y una disminución de la resistencia a las tetraciclinas en *C. jejuni* procedentes de ganado vacuno lechero (75,0 % frente a 43,2 %). La resistencia a los macrólidos se mantuvo estable en tasas bajas y restringidas a *C. coli* del ganado lechero, y todos los *C. coli* resistentes a los macrólidos mostraron un patrón de panresistencia.

### 8.4 Metodologías para la detección

El método de referencia para la detección de *Campylobacter* spp. en productos destinados al consumo humano viene definido en la norma ISO 10272-1:2017 (ISO, 2017b). Este método contempla, tanto la detección mediante enriquecimiento, como la siembra directa en placa. Dicha norma tiene tres submétodos:

- a) Detección por enriquecimiento para muestras con bajos niveles de campilobacterias y microbiota basal.
- b) Detección por enriquecimiento para muestras con bajos niveles de campilobacterias y alto nivel de microbiota basal.
- c) Detección para siembra directa para muestras con alto contenido de campilobacterias.

Para el enriquecimiento del procedimiento (A) se emplea el caldo Bolton e incubación durante 4-6 horas a 37 °C y, a continuación, a 41,5 °C durante 44 horas. Para el procedimiento (B) se emplea el caldo Preston y se incuba a 41,5 °C durante 24 horas. Todas estas incubaciones se realizan en microaerobiosis. A continuación, los caldos enriquecidos se siembran en medios sólidos. Para el procedimiento (A) se siembra en agar mCCD (*Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate*) y otro medio selectivo basado en unos principios de selección diferentes a mCCD como, por ejemplo, el *RAPID Campylobacter Medium* de Biorad o el agar CASA y *CampyFood* de BioMerieux®. Para el procedimiento (B) y (C) se siembra exclusivamente en mCCD. Las placas se incuban a 41,5 °C durante 44 horas en microaerobiosis. Para la confirmación de las colonias sospechosas, se examina la morfología y movilidad, se realiza la prueba de la oxidasa y un análisis de crecimiento aerobio a 25 °C. Además, se pueden emplear pruebas bioquímicas como las galerías API Campy o pruebas moleculares. Existe pues una metodología suficientemente contrastada como se corresponde con un método normalizado. El método ISO ha sido recientemente usado con éxito para aislar *Campylobacter* spp. de muestras de cerdo (Linn et al., 2021). Para la detección cualitativa de *Campylobacter* spp. de muestras de leche, se realizó una dilución 1/10 de la muestra de leche en caldo de enriquecimiento Bolton e incubaron a 37 °C durante 48 horas con 5 % de CO<sub>2</sub> y luego sembraron en mCCDA e incubaron a 42 °C durante 48 horas en atmósfera 5 % de CO<sub>2</sub>. Para realizar contaje se sembraron directamente 100 µl de leche en mCCDA. Además, también se han desarrollado otros métodos que combinan la microbiología clásica con otras técnicas. Por ejemplo, se ha validado el sistema basado en anticuerpos VIDAS (BioMerieux®) en matrices como carne picada de ternera o vegetales (Chon et al., 2011). Otro de los métodos de gran interés es la qPCR. Stingl et al. (2021) desarrollaron un método para la cuantificación de *Campylobacter* spp. termófilos viables totales con un límite de cuantificación de 20 equivalentes genómicos por reacción de PCR. También se han desarrollado métodos moleculares basados en técnicas isotérmicas, que suelen ser más fáciles de aplicar en la industria alimentaria y que se encuentran disponibles comercialmente. Un ejemplo es el ATLAS® *Campylobacter Campy Detection Assay* que se basa en la técnica isotérmica denominada Amplificación Mediada por Transcripción. Esta técnica solo requiere un enriquecimiento de 12 horas y se realiza el análisis molecular sin necesidad de realizar un paso de extracción de ácidos nucleicos (Rishi et al., 2021) y está validado, entre otras matrices, en carne de cerdo y ternera. En cuanto a la caracterización de las cepas, se ha empleado la PCR convencional para la detección, en *Campylobacter* spp., de genes resistencia como *tet(O)* o *blaOXA-61* y genes de virulencia como *flaA*, *cadF* o *cdtA* entre otros (Rangaraju et al., 2022).

## 9. *Escherichia coli* productores de toxinas Shiga

### 9.1 Generalidades

Según la ICMSF (1998), *E. coli* intestinal se define como aquellas cepas de *E. coli* que son capaces de causar una enfermedad diarreica en la especie humana y en los animales. En el microorganismo, a efectos prácticos y con interés clínico, se realiza una subdivisión de las formas patógenas, considerando el mecanismo subyacente a la enfermedad. Se han considerado cuatro tipos principales de *E. coli* patógeno hasta hace aproximadamente dos décadas: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico

(ETEC), *E. coli* enteroinvasor (EIEC) y *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) (en dicho tipo está encuadrado, por ejemplo, *E. coli* O157:H7) (Nataro y Kaper, 1998) (Kaper et al., 2004). Posteriormente se han añadido los patotipos *E. coli* enteroagregativos (EAEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC). El tipo EHEC también se conoce como verotoxigénicos o productores de toxinas Shiga (EHEC/VTEC/STEC).

De acuerdo con lo recogido en un informe del Comité Científico de la AESAN en el año 2012 (AESAN, 2012b) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *E. coli* verotoxigénicos (VTEC)/productores de toxinas Shiga (STEC)/enterohemorrágicos (EHEC), ese grupo de microorganismos y muy especialmente las cepas altamente virulentas del serotipo O157:H7, son patógenos destacables causantes de patologías y procesos muy graves en la especie humana: puede producirse colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH). Se considera a los rumiantes, en particular al ganado vacuno como principal reservorio de este tipo de microorganismos (se trata de una zoonosis), considerándose, como principales vehículos de transmisión, la carne picada, las hamburguesas y los vegetales consumidos crudos o ligeramente cocinados (AESAN, 2012b).

Dada la especial importancia de este agente, el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) ha desarrollado un "protocolo de vigilancia de infección por cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga o verotoxinas" (ISCIII, 2016) y, de acuerdo con dicho protocolo, *E. coli* se clasifica, en muchas ocasiones, en más de 170 serogrupos (O), según las características antigénicas de su lipopolisacárido (LPS) y en serotipos, por la combinación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H). El principal serotipo considerado de *E. coli* productor de toxina Shiga es el O157:H7, pero también pueden ser incluidos (al menos a un nivel clínico) los serotipos O26:H11, O76:H19, O91:H14, O103:H2, O111:H8, O113:H14, O118:H16, O128:H2, O145:H28, O146:H21 u O169:H41 (ISCIII, 2016). El factor de virulencia fundamental y principal de estas cepas es el grupo de citotoxinas denominadas toxinas Shiga: toxina Stx1 o VT1, que puede decirse que es idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* de tipo 1, y la toxina Shiga Stx2 o VT2, que es muy similar y comparte características funcionales idénticas.

Las toxinas Shiga producidas por VTEC se detectan por la prueba de citotoxicidad específica en células Vero, de donde procede esta denominación del grupo (VTEC). Merecen destacarse en el grupo los serotipos O157:H7, O104:H4, O26, O103, O11 y O145 (ACSA, 2019).

En el anexo I de dicho protocolo (ISCIII, 2016) se presenta una encuesta epidemiológica muy detallada, incluyendo diferentes variables epidemiológicas y posibles alimentos causales. En el anexo II se incluye toma y envío de muestras.

En base a los datos recopilados por la EFSA y el Centro Europeo de Enfermedades Infecciosas (ECDC) (EFSA/ECDC, 2021b) los procesos de origen alimentario (toxiinfección alimentaria) por *E. coli* productora de toxinas Shiga en humanos son la cuarta zoonosis más frecuente en la Unión Europea. En 2020 se notificaron 4446 casos de enfermedad por STEC en personas (EFSA/ECDC, 2021b) (AESAN, 2022b).

En España la toxiinfección por VTEC-STEC es, desde hace algunos años, una enfermedad de declaración obligatoria (EDO). En el año 2020 se notificaron 74 casos de STEC-VTEC en personas, siendo la notificación en 2019 de 269 casos (AESAN, 2022b). En la Tabla 1 se detallan los brotes comprobados por VTEC/STEC en España (Mora et al., 2011) (Sánchez et al., 2014).

<b>Tabla 1. Brotes por VETC/STEC en España</b>				
<b>Localización</b>	<b>Año</b>	<b>Afectados/ situación</b>	<b>Seropatotipos</b>	<b>Número de afectados</b>
Ibiza	1986	Turistas británicos en un hotel	O157:H7 Stx2*	3 (+ 3 asintomáticos)
Islas Baleares	1994	Turistas británicos	O157:H7 Stx2 Fagotipo 2 (PT2)*	-
Álava	1995	Chicos en una casa de campo	O111:H- Stx1	13
Fuerteventura	1997	Turistas europeos en 4 hoteles	O157:H7 Stx2 Fagotipo 2 (PT2)	14 (3 con SUH*)
Guipúzcoa	1999	Niños de una guardería	O157:H7	8 (1 con SUH + 6 asintomáticos)
Guipúzcoa	1999	-	O157:H7	2 (1 con SUH + 2 asintomáticos)
Barcelona	2000	Niños de 5 colegios	O157:H7 Stx2 Fagotipo 2 (PT2)	175 (6 con SUH)
Lugo	2003	Brote familiar	O157:H7 Stx1 Stx2 Fagotipo 8 (PT 8)	3
Lugo	2003	Brote familiar	O26:H11 vt	4
Cáceres	2007	-	O157:H7 Stx2 Fagotipo 14 (PT 14)	3
Navarra (Pamplona)	2012	Brote familiar	2 cepas O76:H19 STEC, 6 cepas aEPEC	4 (varios asintomáticos)

\*SUH: Síndrome Urémico Hemolítico; Stx: *Shiga toxin* (toxina Shiga); PT: fagotipo. **Fuente:** (Mora et al, 2011) (Sánchez et al., 2014).

El mayor brote se produjo en el año 2000 en diferentes escuelas en la ciudad de Barcelona y fue causado por el serotipo O157:H7.

Cada cierto tiempo se producen alertas sanitarias alimentarias en relación con VTEC, sin ir más lejos se ha producido una procedente, inicialmente, de Francia en la reciente primavera de 2022, relativa a pizzas congeladas contaminadas (STEC-VTEC O26). Otra alerta alimentaria reciente se ha producido por presencia de *E. coli* productora de toxinas Shiga en queso *Brie* procedente de Francia (ES 2020/91) (AESAN, 2020).

## 9.2 Carne de vacuno

El ganado vacuno puede ser portador de cepas VTEC. Se trata de una zoonosis demostrada. Mora et al. (2011), en relación con el entorno de la ciudad de Lugo, indicaron que, en los años anteriores a dicho año 2011, detectaron una importante disminución de la prevalencia de VTEC-STEC en la carne de vacuno vendida en dicha ciudad. Especialmente importante es la ausencia de positividad para STEC-VTEC O157:H7 en el período 2005–2009. STEC O157:H7 se detectó en 8 casos (0,6 %), y STEC-VTEC no O157 en 146 (10 %), de 1445 muestras analizadas entre los años 1995 y 2009. Ninguna de las cepas STEC-VTEC aislada de vacuno en el entorno de Lugo pertenecía al serotipo O104:H4,

que fue el implicado en la “denominada crisis de los pepinos vendidos en Alemania -en realidad por brotes de fenogreco o alhova-”. Sin embargo, el nivel de las muestras contaminadas con VTEC no O157 seguía siendo demasiado alto, lo que indica la necesidad de extremar la higiene, el control y la vigilancia a lo largo de la cadena alimentaria (AESAN, 2012b).

Cepas de STEC-VTEC pueden encontrarse en ovino y caprino. En relación con el ganado vacuno hay que considerar el medioambiente en el que se encuentra y los animales salvajes de las proximidades. En el estudio de Mora et al. (2012) se concluye y confirma que, en base a los resultados obtenidos, las poblaciones de ciervo, jabalí y el zorro del noroeste de España son portadores de cepas de STEC-VTEC que son potencialmente patógenas para los humanos y contribuyen al mantenimiento y transmisión de VTEC-STEC. Sánchez et al. (2010) realizaron aislamientos VTEC-STEC en rumiantes salvajes como ciervo, gamo, corzo y muflón, lo que ratifica y confirma que los rumiantes salvajes también pueden ser un reservorio de cepas de STEC-VTEC.

### 9.3 Leche cruda

La leche cruda puede llegar a ser un problema dado que, al no existir tratamiento térmico de pasteurización, no hay, lo que se denomina, “tratamiento higienizante terminal”. Es un producto alimentario muy peligroso si no se extreman las condiciones higiénicas de la explotación y planta de procesado. El agente puede, en ciertas circunstancias, aislarse en quesos.

Rey et al. (2006) examinaron 502 muestras de productos lácteos de 64 rebaños ovinos y caprinos diferentes y de 6 plantas lácteas en Extremadura. Se realizó un muestreo mensual entre marzo de 2003 y junio de 2004 y analizaron 360 muestras de leche sin pasteurizar obtenidas de tanque a granel (tanque de almacenamiento de leche), 103 muestras de cuajada de queso fresco y 39 de queso. Se detectaron cepas VTEC-STEC en 39 (11 %) de las muestras del tanque a granel, 4 (4 %) de los de queso fresco cuajada, y 2 (5 %) de las de queso. Se aisló O157: serotipo H7 de una muestra de tanque a granel (0,3 %). Un total de 9 cepas VTEC-STEC (O27:H18, O45:H38, O76:H19, O91:H28, O157:H7, ONT:H7, ONT:H9 y ONT:H21) fueron identificadas en dicha investigación.

Hay un estudio realizado en Extremadura (Sánchez et al., 2010), donde se analizaron, caracterizado y tipificado 46 aislamientos de *E. coli* O157:H7 obtenidos de las heces de diferentes rumiantes sanos (ganado vacuno, ovejas y ciervo común) y de leche de cabra no pasteurizada durante un período de 11 años (1997-2008). Dichos aislamientos procedían de estudios previos realizados en la propia comunidad autónoma. Se detectó una cepa atípica de *E. coli* O157:H7 (fermentadora de sorbitol y  $\beta$ -glucuronidasa positiva) procedente de heces de ciervo. Los genes que codifican las toxinas Shiga estaban presentes en el 69,6 % de los aislamientos y todos ellos portaban solo el gen Stx2. Los aislados procedían de nueve tipos fágicos diferentes, aunque el 67,4 % se restringió a solo tres: PT14, PT34 y PT54. PT54 fue el tipo de fago más prevalente y se detectó en aislamientos de bovinos, ovinos y venados. La mayoría de los aislamientos procedían de tipos de fagos encontrados previamente en cepas asociadas con la infección humana.

En otro estudio realizado en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, Caro et al. (2007) caracterizaron 13 VETC-STEC cepas aisladas de productos lácteos de oveja en Castilla y León. 8 cepas aisladas de la leche pertenecían al serotipo O157:H7. 3 cepas STEC (2 del serogrupo O14 y 1 ONT) se

detectaron en 2 muestras (2,4 %) de queso tipo Castellano, uno con unos 2,5 meses de maduración y el otro con un período de maduración de 12 meses.

También en la misma Comunidad Autónoma de Castilla y León se realizaron otros estudios relativos a leche cruda y quesos elaborados a partir de la misma, teniendo en cuenta el ambiente y los equipos de la explotación. Se ha investigado en leche cruda de cabra (Álvarez, 2014), leche cruda de oveja (Otero, 2014) y leche cruda de vaca (Rios, 2018). En los tres tipos de leche cruda se aislaron cepas STEC-VTEC, por ello hay que enfatizar la importancia del extremo cuidado en las condiciones higiénicas de las granjas, salas de ordeño e instalaciones de procesado de leche.

#### 9.4 Verduras de hoja verde

Ceuppens et al. (2015) realizaron un amplio estudio colaborativo en relación a la producción primaria y la inocuidad alimentaria con respecto a las verduras de hoja verde. En él se contrastó y evaluó la calidad microbiológica y la seguridad alimentaria de las verduras de hoja verde y fresas en producción primaria en diferentes países, en concreto Bélgica, Brasil, Egipto, Noruega y España, mediante recuentos de *E. coli* (un microorganismo marcador de condiciones higiénicas e índice de contaminación fecal en aguas) y detección de *Salmonella* spp., *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *Campylobacter* spp.

Las muestras de agua eran más propensas a contener patógenos (54 positivos de 950 análisis) que el suelo (16/1186) y productos del campo (18/977 para verduras de hoja verde y 5/402 para fresas). La prevalencia de patógenos también varió notablemente según la región geográfica donde se muestreó. La irrigación de los campos de cultivo aumentó considerablemente el riesgo, con *odds ratio* (OR) de 10,9 para *Salmonella* spp. y de 7,0 para STEC. Se presentó una asociación significativa entre recuentos elevados de *E. coli* indicador genérico y la detección de patógenos (OR de 2,3 para STEC-VTEC y 2,7 para *Salmonella*). En la investigación se encontró que, como era de suponer, *E. coli* indicador genérico es un microorganismo índice o indicador adecuado para *Salmonella* spp. y STEC-VTEC, pero en menor medida para *Campylobacter* spp. En el artículo se plantea que deben tenerse en cuenta directrices precisas o guías recomendadas sobre la frecuencia en los muestreos y sobre el valor umbral para *E. coli* en el agua de riego y que pueden diferir de una región a otra. En la investigación, las muestras positivas para STEC-VTEC aparecen en agua y suelo, no en verduras y fresas.

Los datos de muestreo en relación a España proceden de los estudios de Castro-Ibañez et al. (2015a, b). Un trabajo reciente y muy interesante es el de Truchado et al. (2021) en relación con los nuevos estándares a nivel de la Unión Europea sobre reutilización de agua para riego agrícola y su relación con las estaciones depuradoras de aguas residuales españolas, en la Tabla 2 de dicho trabajo se presentan resultados en relación con diferentes puntos de muestreo. En la entrada de las plantas de tratamiento se observa un número notable de muestras con detección de STEC-VTEC no O157:H7 y *E. coli* O157:H7 (en ambos casos prevalencia del 100 %, tanto en uno como en el otro), y se observa alguna muestra a nivel de cultivo que es positiva (3/100) a STEC-VTEC no O157:H7.

#### 9.5 Metodologías para la detección

En cuanto a detección e identificación, se utilizan métodos culturales (especialmente desarrollados para VTEC/STEC O157:H7, los no O157 a veces son complicados en su detección e identificación),

métodos serológicos, PCR convencional y PCR cuantitativa. Una técnica extremadamente útil para la tipificación es la PFGE.

Hay una norma ISO aplicable a STEC-VTEC que es la ISO/TS 13136:2012: “Microbiología de alimentos y piensos. Método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Método horizontal para la detección de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y la determinación de serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145” (ISO, 2012).

Información detallada y contrastada en relación con métodos para detección y caracterización de STEC-VETC la encontramos en el informe de la EFSA relativo a “STEC y riesgos planteados para la salud pública debidos a la contaminación de los alimentos por STEC” (EFSA, 2020). En dicho informe se revisan los métodos para detectar STEC-VTEC que son: (1) uso de métodos de cultivo basados en medios selectivos y diferenciales -entre ellos tenemos el conocido agar sorbitol Mac-Conkey-, y utilización de cultivos celulares; (2) métodos inmunológicos (como kits ELISA, perlas inmunomagnéticas -permiten una concentración o enriquecimiento-); y (3) métodos moleculares (detección de genes codificantes de la toxina Shiga; en dicho informe se indica que últimamente se ha realizado una aproximación metagenómica en relación con la detección directa y caracterización de STEC-VETC en muestras de heces).

El informe incluye métodos basados en PCR (convencional y en tiempo real); métodos estandarizados para la detección de STEC-VTEC en alimentos y piensos, como la norma ISO 13136:2021 ya mencionada o la ISO 16654:2001 (en dicha norma hay una concentración inmunomagnética utilizando perlas magnéticas, en 2018 hay una enmienda o modificación de la misma); métodos utilizables para tipificar las cepas STEC-VETC mediante serotipia y serotipificación molecular, y fagotipia (ISO, 2001).

Para subtipificación y caracterización-huella molecular en estudios epidemiológicos y poblacionales son útiles los métodos de tipificación molecular como la PFGE y análisis MLVA. WGS puede ser una herramienta muy útil, también tipaje por SNPs.

Por otra parte, en el *Bacteriological Analytical Manual* de Estados Unidos (BAM Council, 2022) encontramos una buena y contrastada descripción de métodos recopilada por Feng et al. (2020).

## 10. Encefalitis vírica transmitida por garrapatas

### 10.1 Generalidades

La encefalitis vírica transmitida por garrapatas (TBE, *Tick-Borne Encephalitis*) es una enfermedad grave de declaración obligatoria en la Unión Europea desde 2012 y que hoy en día se considera endémica en muchos países europeos (Amicizia et al., 2013). En 2019, en la Unión Europea se notificaron un total 3411 casos (0,7 por 100 000) (ECDC, 2021), de los cuales, 15 casos estuvieron asociados a 3 brotes alimentarios, con un 80 % de los casos hospitalizados (EFSA/ECDC, 2021a). Estos datos representan un incremento comparado con la tasa del 0,6 que se había descrito en años anteriores. Los casos de TBE generalmente presentan un pico estacional en los meses de julio y agosto. Los casos notificados son más elevados en los hombres adultos con edades comprendidas entre los 45 y 64 años, asociado a una mayor probabilidad de estar expuestos a garrapatas durante actividades al aire libre y al menor

uso de medidas preventivas (Lindquist et al., 2008) (Jepsen et al., 2019). España permanece libre de la enfermedad, aunque existe el vector principal que son las garrapatas del género *Ixodes* (ECDC, 2020) y se ha descrito un caso importado asociado a productos lácteos en Estonia (Camprubí et al., 2020).

El TBEV (*Tick-Borne Encephalitis Virus*) es un virus de ARN con envuelta, que pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. La enfermedad se presenta en dos fases diferenciadas. Una primera fase de viremia asintomática o con síntomas pseudogripales de 2 a 8 días de duración. Y una segunda fase que se caracteriza por la afectación del sistema nervioso central, de 2 a 4 semanas de duración después de la infección. El cuadro clínico puede cursar como meningitis, encefalitis, o meningoencefalomielitis. Un alto porcentaje de estos enfermos (35-58 %) sufrirán secuelas y la tasa de letalidad en pacientes adultos se sitúa entre 1-3 %.

## 10.2 Transmisión

La forma normal de transmisión más frecuente en humanos es por la picadura de una garrapata, ya que estas son los vectores principales y reservorios del TBEV. La leche cruda de cabra, vaca y oveja pueden contener el virus y también puede ser una fuente de infección para el hombre. El virus infeccioso se ha aislado de derivados lácteos incluyendo yogur, mantequilla y queso (AESAN, 2015).

En los países de la Europa del Este es común la transmisión alimentaria por ingestión de leche cruda de oveja o cabra donde los brotes familiares son frecuentes por esta vía. En el último informe del ECDC del año 2020, se detectaron 5 brotes de TBEV en Austria y Eslovaquia, con 12 casos, todos ellos requirieron hospitalización debido al consumo de leche sin pasteurizar (EFSA/ECDC, 2021b). En este último informe, se destaca que Eslovenia realizó una monitorización en 19 muestras de leche cruda de cabra y oveja, no detectándose la presencia del virus en ninguna de ellas.

## 10.3 Estabilidad y supervivencia de TBEV en leche y productos lácteos

En general, los flavivirus son relativamente sensibles a la temperatura y los detergentes, aunque el TBEV no se inactiva completamente en leche de cabra después de 30 minutos de tratamiento a 65 °C y es necesario tratamientos a 100 °C durante 3 minutos para eliminar completamente la infectividad (Balogh et al., 2012).

En otro estudio reciente, Rónai y Egyed (2020) compararon la supervivencia del TBEV a distintas condiciones de pasteurización en leche de cabra y en quesos elaborados con o sin sal. Ambos métodos de pasteurización, a 63 °C 30 minutos o a 72 °C, 15 segundos, inactivaron completamente la infectividad del TBEV. Paralelamente, se detectaron virus infecciosos después de 10-25 días en leche cruda y en queso elaborado sin sal, dependiendo de la concentración inicial de virus. El virus sobrevivió en leche cruda durante 3 semanas de almacenamiento a 4 °C y en queso elaborado sin sal durante 2 semanas. Tanto la pasteurización como la presencia de sal hicieron que ni en la leche de cabra ni en los quesos elaborados con esta leche se detectara la presencia del TBEV. Estos hallazgos subrayan que la forma más segura y sencilla de evitar la TBE transmitida por la leche es hervir/pasteurizar la leche antes de beberla, y si el consumidor insiste en la leche cruda, es importante inmunizar a los animales frente al TBEV en áreas endémicas.

## 10.4 Metodologías para la detección

En la actualidad no se dispone de métodos estandarizados y validados para la detección cualitativa o cuantitativa del TBEV en las matrices alimentarias de mayor riesgo, leche y sus derivados. Aunque se dispone de distintos métodos publicados que describen la metodología para aislar TBEV a partir de leche, en alguno de ellos se ha utilizado la detección de anticuerpos de TBEV en leche, utilizando técnicas de ELISA y una posterior confirmación mediante *Western blot* (Wallenhammar et al., 2020). Métodos moleculares se han utilizado para la detección de TBEV en muestras de leche y queso, basados en una etapa de aislamiento del virus de la matriz alimentaria, purificación del RNA viral y posteriormente su detección mediante RT-qPCR (Balogh et al., 2012) (Hennechart-Collette et al., 2022). Una de las limitaciones más importantes de estas técnicas moleculares es que el resultado positivo de la PCR no permite confirmar la infectividad del virus detectado.

## Conclusiones del Comité Científico

El presente informe prospectivo aborda el interés de controlar, en alimentos en España, un grupo de bacterias, así como un peligro vírico. Inicialmente, cabe englobar en un primer apartado la prospección sobre *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* multirresistentes. Estos microorganismos se engloban dentro del acrónimo ESKAPE, que recoge a bacterias que, a causa de su multirresistencia, provocan una clínica en las personas altamente compleja. Un aspecto común a estos agentes es el interés que se ha presentado en muchos países del mundo y también de nuestro entorno (Europa) con un bajo número de datos de nuestro país en relación a su prevalencia y poblaciones de estos agentes encontrados en los alimentos, lo cual hace muy necesario disponer de los mismos, teniendo, además, en cuenta, que la población de riesgo tiende a aumentar. En base a la propuesta inicial, donde no se había considerado inicialmente, ni para *A. baumannii* ni para *K. pneumoniae*, la investigación en ensaladas de forma específica, los datos consignados aconsejan la introducción de este alimento en las búsquedas prospectivas.

Según la información reportada, se destaca la importancia de la transmisión de *P. aeruginosa* en ambientes clínicos y muestras alimentarias de origen vegetal destinadas a consumo en crudo. La aparición de cepas multirresistentes, junto con la elevada morbi-mortalidad en la población inmunodeprimida, hacen necesario el desarrollo de métodos lo suficientemente sensibles para su detección en alimentos. Asimismo, en el caso de *Campylobacter* spp. en carnes, aparte de origen avícola, dada la prevalencia hallada en granjas de vacuno, ovino y porcino, así como el incremento del número de muestras positivas en los estudios consignados, se considera importante la investigación en estas fuentes. También, aunque siempre se ha señalado a las carnes de aves como responsables de la transmisión de esta toxiinfección, sigue existiendo un alto número de casos en las personas, que no proceden de la carne de ave. Asimismo, hay evidencias del incremento de las multirresistencias en estas bacterias, lo cual es un dato adicional a tener presente.

Lo mismo se desprende de los datos en nuestro país relativos a *E. coli* productores de toxinas Shiga, donde se comprueba que los brotes que ha habido aconsejan el control de las matrices propuestas (carne de vacuno, leche cruda y verduras de hoja).

Los casos de enfermedades causadas por *B. cereus* y *Cronobacter* spp. son, en principio, menores, aunque en ambos casos las harinas y productos pulverulentos permiten la supervivencia de estos agentes de forma especial.

Finalmente, el único peligro vírico consignado, productor de encefalitis transmitida por garrapatas, resulta importante por el hecho de la gran dispersión de las garrapatas transmisoras en España. Por otra parte, la presencia, en ocasiones, en productos lácteos crudos, junto con la posibilidad del consumo de leche cruda, puede aconsejar disponer de más datos. Un inconveniente en este caso es la metodología, dado que la investigación de virus con capacidad infectiva es compleja y los métodos de búsqueda por PCR no aportan información sobre dicha capacidad infectiva, aunque disponer de dicha información resultaría, a nuestro juicio, relevante. Para el resto de peligros causados por bacterias objeto de este estudio está disponible metodología clásica robusta y también métodos avanzados de control e identificación.

## Referencias

- Abouelnaga, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J.M., Cepeda, A. y Franco, C.M. (2016). Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococci* isolated from fermented and unfermented foods. *Annals of Microbiology*, 66, pp: 577-585.
- ACSA (2019). Agencia Catalana de Salud Pública. Mapa de peligros alimentarios. Peligro biológico - Bacteria. *E. coli* verotoxigénica (STEC/VTEC). Disponible en: [https://acsa.gencat.cat/web/.content/\\_A\\_Z/E/inf\\_relacionada/E-coli-verotoxi\\_ES\\_MP.pdf](https://acsa.gencat.cat/web/.content/_A_Z/E/inf_relacionada/E-coli-verotoxi_ES_MP.pdf) [acceso: 28-06-22].
- Adeyemi, F.M., Ojo, O.O., Badejo, A.A., Oyedara, O.O., Olaitan, J.O., Adetunji, C.O., Hefft, D.I., Ogunjobi, A.A. y Akinde, S.B. (2022). Integrated poultry-fish farming system encourages multidrug-resistant gram-negative bacteria dissemination in pond environment and fishes. *Aquaculture*, 548: 737558.
- AESAN (2012a). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de *Campylobacter* spp en carne fresca de aves (pollo). *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 16, pp: 21-55.
- AESAN (2012b). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VETC/STEC/EHEC). *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 16, pp: 71-100.
- AESAN (2015). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados a base de leche cruda. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 21, pp: 45-78.
- AESAN (2018). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la prospección de peligros biológicos de interés en seguridad alimentaria en España. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 28, pp: 11-67.
- AESAN (2022a). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Campilobacteriosis. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/campilobacteriosis.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/campilobacteriosis.htm) [acceso: 28-06-22].
- AESAN (2022b). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Toxiinfección por *Escherichia coli*. Seguridad Alimentaria/Gestión de Riesgos/Seguridad Biológica/Enfermedades de transmisión alimentaria/Toxiinfección por *Escherichia coli*. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/Escherichia\\_coli.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/Escherichia_coli.htm) [acceso: 28-06-22].
- Aguilar-Bultet, L., Bagutti, C., Egli, A., Alt, M., Pekerman, L.M., Schindler, R., Furger, R., Eichenberger, L., Roloff, T.,

- Steffen, I., Huebner, P., Stadler, T. y Tschudin-Sutter, S. (2020). Identification of a Cluster of Extended-spectrum Beta-Lactamase–Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 101 Isolated from Food and Humans. *Clinical Infectious Diseases*, 73 (2), pp: 332-335.
- Allydice-Francis, K. y Brown, P.D. (2012). Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. *International Journal of Microbiology*, 2012: 426241.
- Alsonosi, A., Hariri, S., Kajsík, M., Orišková, M., Hanulík, V., Röderová, M., Petrželová, J., Kollarová, H., Drahovská, H., Forsythe, S. y Holý, O. (2015). The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalised patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases*, 34 (10), pp: 1979-1988.
- Álvarez, M.E. (2014). Caracterización de tipos patógenos de *Escherichia coli* y otros peligros biológicos asociados a la leche de cabra y productos derivados [tesis doctoral]. Universidad de León. Disponible en: [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3607/tesis\\_8d55c0.PDF?sequence=1&isAllowed=y](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3607/tesis_8d55c0.PDF?sequence=1&isAllowed=y) [acceso: 28-06-22].
- Amicizia, D., Domnich, A., Panatto, D., Lai, P.L., Cristina, M.L., Avio, U. y Gasparini, R. (2013). Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapy*, 9 (5), pp: 1163-1171.
- Asif, M., Alvi, I.A. y Rehman, S.U. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, alternative modalities. *Infection and Drug Resistance*, 11, pp: 1249-1260.
- Bagley, S. y Seidler, R. (1978). Primary *Klebsiella* identification with MacConkey-inositol-carbenicillin agar. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, pp: 536-538.
- Balciunas, E.M., Martínez, F.A.C., Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Converti, A. y de Souza Oliveira, R.P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32 (1), pp: 134-142.
- Balogh, Z., Egyed, L., Ferenczi, E., Bán, E., Szomor, K.N., Takács, M. y Berencsi, G. (2012). Experimental Infection of Goats with Tick-borne Encephalitis virus and the Possibilities to prevent virus transmission by raw goat milk. *Intervirology*, 55, pp: 194-200.
- BAM Council (2022). Bacteriological Analytical Manual, U.S. FDA. Washington D.C.: Food and Drug Administration. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam> [acceso: 28-06-22].
- Barreiro, E. (2018). Analysis of Pyogenic Liver Abscesses. *Annals of Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2, pp: 1-4.
- Barron, J.C. y Forsythe, S.J. (2007). Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, 70 (9), pp: 2111-2117.
- Bassetti, M., Ginocchio, F. y Mikulska, M. (2011). New treatment options against gram-negative organisms. *Critical Care*, 15: 215.
- Baumgartner, A., Grand, M., Liniger, M. y Iversen, C. (2009). Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 131, pp: 189-192.
- Beijerinck, M.W. (1911). Über Pigmentbildung bei Essigbakterien. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene*, 29, pp: 167-176.
- Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E. y Pitt, T.L. (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 42, pp: 201-204.
- Berthold-Pluta, A., Garbowska, M., Stefanska, I. y Pluta, A. (2017). Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 65, pp: 221-230.
- Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L.C., Ryu, J.H. y Richards, G.M. (2009). *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp: 204-213.

- BOE (1995). Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica. BOE N° 21 de 24 de enero de 1996, pp: 2153-2158.
- Borremans, A., Smets, R. y Van Campenhout, L. (2020). Fermentation *Versus* Meat Preservatives to Extend the Shelf Life of Mealworm (*Tenebrio molitor*) Paste for Feed and Food Applications. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1510.
- Boué, G., Guillou, S., Antignac, J.P., Le Bizec, B. y Membré, J.M. (2015). Public Health Risk-benefit Assessment Associated with Food Consumption-A Review. *European Journal of Food Research & Review*, 5 (1), pp: 32-58.
- Bouvet, P.J.M. y Grimont, P.A.D. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36, pp: 228-240.
- Brady, C., Cleenwerck, I., S. Venter, S., Coutinho, T. y De Vos, P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, 36, pp: 309-319.
- Brandao, M.L.L., Umeda, N.S., Jackson, E., Forsythe, S.J. y de Filippis, I. (2017). Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiology*, 63, pp: 129-138.
- Camprubí, D., Moreno-García, E., Almuedo-Riera, A., Martínez, M.J., Navarro, A., Martínez-Hernández, E. y Ambrosioni, J. (2020). First imported case of tick-borne encephalitis in Spain - was it alimentary? *Travel Medicine and Infectious Disease*, 37: 101701.
- Capatina, D., Feier, B., Hosu, O., Tertis, M. y Cristea, C. (2022). Analytical methods for the characterization and diagnosis of infection with *Pseudomonas aeruginosa*: A critical review. *Analytical Chimica Acta*, 1204: 339696.
- Caro, I., Mateo, J. y García-Armeño M.R. (2007). Phenotypical characteristics of Shiga-like toxin *Escherichia coli* isolated from sheep dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 45, pp: 295-300.
- Carvalho, A., Casquete, R., Silva, J. y Teixeira, P. (2017a). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology*, 243, pp: 58-63.
- Carvalho, A., Ferreira, V., Silva, J. y Teixeira, P. (2016). Enrichment of *Acinetobacter* spp from food samples. *Food Microbiology*, 55, pp: 123-127.
- Carvalho, A., Silva, J. y Teixeira, P. (2017b). Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant *Acinetobacter* spp. *Food Microbiology*, 64, pp: 119-125.
- Castro-Ibañez, I., Gil, M.I., Tudela, J.A. y Allende, A. (2015a). Microbial safety considerations of flooding in primary production of leafy greens: A case study. *Food Research International*, 68, pp: 62-69.
- Castro-Ibañez, I., Gil, M.I., Tudela, J.A., Ivánek, R. y Allende, A. (2015b). Assessment of microbial risk factors and impact of meteorological conditions during production of baby spinach in the Southeast of Spain. *Food Microbiology*, 49, pp: 173-181.
- Cawthorn, D.M., Botha, S. y Witthuhn, R.C. (2008). Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 127, pp: 129-138.
- CDC (2022). Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos. *Cronobacter*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/cronobacter/index.html> [acceso: 28-06-22].
- Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A. y Ghelardi, E. (2019). Identification of *Bacillus* species: implication on the quality of probiotic formulations. *PLoS One*, 14: e0217021.
- Cetinkaya, E., Joseph, S., Ayhan, K. y Forsythe, S.J. (2013). Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. *Molecular and Cellular Probes*, 27 (1), pp: 60-64.
- Ceuppens, S., Johannessen, G.S., Allende, A., Tondo, E.C., El-Tahan, F., Sampers, I., Jacxsens, L. y Uyttendaele, M. (2015). Risk Factors for *Salmonella*, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* Occurrence in Primary Production of Leafy Greens and Strawberries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12 (8), pp: 9809-9831.

- Cezario, R.C., de Mororais, D.L., Ferreira, J.C., Costa-Pinto, R.M., Darini, A.L.C. y Gontijo-Filho, P.P. (2009). Nosocomial outbreak by imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamase in adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, pp: 269-274.
- Chen, W., Yang, J., You, C. y Liu, Z. (2016). Diversity of *Cronobacter* spp. isolates from the vegetables in the middle-east coastline of China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32 (6), 90.
- Chen, Y., Lampel, K. y Hammack, T. (2012). *Cronobacter*. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Laboratory Methods (food). Food and Drug Administration. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-29-cronobacter> [acceso: 28-06-22].
- Chon, J.W., Hyeon, J.Y., Choi, I.S., Park, C.K., Kim, S.K., Heo, S., Oh, S.W., Song, K.Y. y Seo, K.H. (2011). Comparison of three selective media and validation of the VIDAS *Campylobacter* assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in ground beef and fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, 74 (3), pp: 456-460.
- Ciginskiene, A., Dambrauskienė, A., Rello, J. y Adukauskienė, D. (2019). Ventilator-Associated Pneumonia due to Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk Factors and Mortality Relation with Resistance Profiles, and Independent Predictors of In-Hospital Mortality. *Medicina*, 55: 49.
- Ciui, B., Jambrec, D., Sandulescu, R. y Cristea, C. (2017). Bioelectrochemistry for miRNA Detection. *Current Opinion in Electrochemistry*, 5, pp: 183-192.
- CLSI (2012). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility Testing: 22nd Informational Supplement. M100-S22.CLSI, Wayne, PA.
- Corcionivoschi, N. y Gundogdu, O. (2021). Foodborne Pathogen *Campylobacter*. *Microorganisms*, 9 (6): 1241.
- Correa, C.M.C., Tibana, A. y Gontijo Filho, P.P. (1991). Vegetables as a source of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a University and Oncology Hospital of Rio de Janeiro. *Journal of Hospital Infection*, 18, pp: 301-306.
- Davis, G.S. y Price, L.B. (2016). Recent Research Examining Links among *Klebsiella pneumoniae* from Food animals, and human Extraintestinal Infections. *Current Environmental Health Reports*, 3, pp: 128-135.
- Díaz-Agero, C., López-Fresneña, N., Rincon, A.L., Hernandez, M., Ruiz-Garbajosa, P., Aranaz-Andres, J.M., Maechler, F., Gastmeier, P., Bonten, M.J.M. y Canton, R. (2019). Local prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: a prevalence survey in a Spanish University Hospital. *British Medical Journal Open*, 9: e024879.
- Domingues, S., Rosario, N., Candido, A., Neto, D., Nielsen, K.M. y Da Silva, G.J. (2019). Competence for Natural Transformation Is common among clinical strains of Resistant *Acinetobacter* spp. *Microorganisms*, 7: 30.
- ECDC (2020). Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. Tick maps. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps> [acceso: 28-06-22].
- ECDC (2021). Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. Tick-borne encephalitis. Annual epidemiological report for 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-TBE-2019.pdf> [acceso: 28-06-22].
- EFSA (2016). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. Including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14 (7): 4524, pp: 1-93.
- EFSA (2020). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. 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): 5967, pp: 1-105.
- EFSA/ECDC (2021a). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19 (2): 6406, pp: 1-286.
- EFSA/ECDC (2021b). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19 (12): 6971, pp: 1-324.

- Elkhwaga, A.A., Hetta, H.F., Osman, N.S., Hosni, A. y El-Mokhtar, M.A. (2020). Emergence of *Cronobacter sakazakii* in cases of neonatal sepsis in Upper Egypt: First report in North Africa. *Frontiers in Microbiology*, 11: 215.
- El-Sharoud, W.M., O'Brien, S., Negredo, C., Iversen, C., Fanning, S. y Healy, B. (2009). Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiology*, 9, pp: 18-29.
- EPINE (2019). Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Estudio de prevalencia de enfermedades nosocomiales en España. Estudio EPINE. *EPPS*, 30. Disponible en: <https://epine.es/api/documento-publico/2019%20EPINE%20Informe%20Espa%C3%B1a%202021112019.pdf/reports-esp> [acceso: 28-06-22].
- FAO/OMS (2006). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Disponible en: <https://www.fao.org/3/a0512s/a0512s.pdf> [acceso: 28-06-22].
- Feng, P., Weagant, S.D. y Jinneman, K. (2020). BAM Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual, U.S. FDA, Washington D.C.: Food and Drug Administration. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli> [acceso: 28-06-22].
- Finkelstein, S., Negrete, F., Jang, H., Gangiredla, J., Mammel, M., Patel, I.R., Chase, H.R., Woo, J., Lee, Y., Wang, C.Z., Weinstein, L., Tall, B.D. y Gopinah, G.R. (2019). Prevalence, distribution, and phylogeny of type two toxin-antitoxin genes possessed by *Cronobacter* species where *C. sakazakii* homologs follow sequence type lineages. *Microorganisms*, 7 (11): 554.
- Forsythe, S.J. (2018). Updates on the *Cronobacter* genus. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, pp: 23-44.
- Forsythe, S.J., Dickins, B. y Jolley, K.A. (2014). *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. *BMC Genomics*, 15: 1121.
- Friedemann, M. (2007). *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *International Journal of Food Microbiology*, 116 (1), pp: 1-10.
- Friedemann, M. (2009). Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *European Journal of Clinical and Microbiology Infection Diseases*, 28 (11), pp: 1297-1304.
- Garbowska, M., Berthold-Pluta, A. y Stasiak-Rozanska, L. (2015). Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 49, pp: 1-5.
- Gicova, A., Orieskova, M., Oslanecova, L., Drahovska, H. y Kaclikova, E. (2014). Identification and characterization of *Cronobacter* strains isolated from powdered infant foods. *Letters in Applied Microbiology*, 58 (3), pp: 242-247.
- González, C.J., Santos, J.A., García-López, M.L. y Otero, A. (2000). Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *Journal of Food Protection*, 63 (2), pp: 315-321.
- Grabowski, N.T. y Klein, G. (2017). Microbiology of processed edible insect products - Results of a preliminary survey. *International Journal of Food Microbiology*, 243, pp: 103-107.
- Gundogan, N. y Avci, E. (2013). Prevalence and antibiotic resistance of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species isolated from foods of animal origin in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (31), pp: 4059-4064.
- Guo, X., Yu, Zh., Zhao, F., Sun, Zh., Kwok, L.Y. y Shengli, L. (2021). Both sampling seasonality and geographic origin contribute significantly to variations in raw milk microbiota, but sampling seasonality is the more determining factor. *Journal of Dairy Science*, 104, pp: 10609-10627.
- Guo, Y., Zhou, H., Qin, L., Pang, Z., Qin, T., Ren, H., Pan, Z. y Zhou, J. (2016). Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Food Samples. *PlosONE*, 11 (4): e0153561.
- Han, L., Gao, Y., Liu, Y., Yao, S., Zhong, S., Zhang, S., Wang, J., Mi, P., Wen, Y., Ouyang, Z., Zhang, J., Al-Shamiri, M.M., Li, P. y Han, S. (2022). An Outer membrane protein YiaD Contributes to Adaptive Resistance of Meropep- nem in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology Spectrum*, 10 (2), pp: 1-13.
- Hartantyo, S.H.P., Chau, M.L., Koh, T.H., Yap, M., Yi, T., Cao, D.Y.H., Gutiérrez, R.A. y NG, L.C. (2020). Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and risks to Food Safety. *Journal of Food Protection*, 83 (7), pp: 1096-1103.

- Haryani, Y., Noorzaleha, A.S., Fatimah, A.B., Noorjahan, B.A., Patrick, G.B., Shamsinar, A.T., Laila, R.A.S. y Son, R. (2007). Incidence of *Klebsiella pneumoniae* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling and RAPD-PCR analysis. *Food Control*, 18, pp: 847-853.
- Hennechart-Collette, C., Gonzalez, G., Fourniol, L., Fraisse, A., Beck, C., Moutailler, S., Bournez, L., Dheilly, N.M., Lacour, S.A., Lecollinet, S., Martin-Latil, S. y Perelle, S. (2022). Method for tick-borne encephalitis virus detection in raw milk products. *Food Microbiology*, 104: 104003.
- Henry, M. y Fouladkhah, A. (2019). Outbreak history, biofilm formation, and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. *Microorganisms*, 7 (3): 77.
- Holý, O. y Forsythe, S. (2014). *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, 86, pp: 169-177.
- Houang, E.T.S., Chu, Y.W., Leung, C.M., Chu, K.Y., Berlau, J., Ng, K.C. y Cheng, F.B. (2001). Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (1), pp: 228-234.
- Hu, S., Yu, Y. y Xiao, X. (2018). Stress resistance, detection and disinfection of *Cronobacter* spp. in dairy products: A review. *Food Control*, 85, pp: 400-415.
- Hunter, C.J. y Bean, J.F. (2013). *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. *Journal of Perinatology*, 33 (8), pp: 581-585.
- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, S. y Forsythe, S.J. (2009). Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Food Microbiology*, 136 (2), pp: 227-231.
- ICMSF (1998). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos. Volumen 5. Acribia, Zaragoza.
- ICMSF (2002). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbiological testing in food safety management. Boston (USA): Springer.
- ISCIII (2016). Protocolo de vigilancia de infección por cepas de *Escherichia coli* productoras de Toxina Shiga o verotoxina (SETC/VTEC). Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/EColi.aspx> [acceso: 28-06-22].
- Islar, B., Doi, Y., Bonomo, R.A. y Paterson, D.L. (2019). New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63: e0111018.
- ISO (2001). International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO 16654:2001.
- ISO (2008). International Organization for Standardization. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Method by membrane filtration. ISO 16266:2008.
- ISO (2012). International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. ISO/TS 13136: 2012.
- ISO (2017a). International Organization for Standardization. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. Geneva (Switzerland). ISO 22964: 2017.
- ISO (2017b). International Organization for Standardization. Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method. ISO 10272-1: 2017.
- Iversen, C., Lane, M. y Forsythe, S.J. (2004b). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38 (5), pp: 378-382.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. y Joosten, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 64.

- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R. y Joosten, H. (2008). *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (6), pp: 1442-1447.
- Jaradat, Z.W., Ababneh, Q.O., Saadoun, I.M., Samara, N.A. y Rashdan, A.M. (2009). Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiology*, 9: 225.
- Jepsen, M.T., Jokelainen, P., Jore, S., Boman, A., Slunge, D. y Krogfelt, K.A. (2019). Protective practices against tick bites in Denmark, Norway and Sweden: a questionnaire-based study. *BMC Public Health*, 19 (1), pp: 1-10.
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Barreiro, P., Vieira, L., Moura, I.B. y Caniça, M. (2016). Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from Gram negative bacteria recovered among fruits and vegetables. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1400.
- Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M. y Forsythe, S. J. (2012). *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies* 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, pp: 1277-1283.
- Juma, N.A., Manning, G. y Forsythe, S.J. (2016). Desiccation survival of *Acinetobacter* spp. In infant formula. *Food Control*, 68, pp: 162-166.
- Kandhai, M.C., Reij, M.W., Gorris, L.G., Guillaume-Gentil, O. y van Schothorst, M. (2004). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet*, 363 (9402), pp: 39-40.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. y Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp: 123-140.
- Kent, R.M., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C. y Ross, R.P. (2015). Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*, 7 (2), pp: 1217-1244.
- Kerr, K.G. y Snelling, A.M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73, pp: 338-344.
- Kim, H., Ryu, J.H. y Beuchat, L.R. (2006). Attachment and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, pp: 5846-5856.
- Kim, H., Ryu, J.H. y Beuchat, L.R. (2007). Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp: 1256-1265.
- Kim, S.H., Wei, C.I., Tzou, Y.M. y An, H. (2005). Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Farm Environments and Retail Products in Oklahoma. *Journal of Food Protection*, 68 (10), pp: 2022-2029.
- Ko, W.C., Paterson, D.L., Sagnimenti, A.J., Hansen, D.S., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., Casellas, J.M., Goossens, H., Mulazimoglu, L., Trenholme, G., Klugman, K.P., Mc Cormack, J.G. y Yu, V.L. (2002). Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (2), pp: 160-166.
- Kominos, S.D., Copeland, C.E., Grosiak, B. y Postic, B. (1972). Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Applied Microbiology*, 24, pp: 567-570.
- Kone, A., Adingra, A.A., Kambire, O. y Amenan, R.K. (2022). Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* isolated from universities restaurants of Abidjan, Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 10 (01), pp: 206-212.
- Lanini, S., D'Arezzo, S., Puro, V., Martini, L., Imperi, F., Piselli, P., Montanaro, M., Paoletti, S., Visca, P. e Ippolito, G. (2011). Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser: *PLoS One*, 6: e17064.

- Lazcka, O., Del Campo, F.J. y Muñoz, F.X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, pp: 1205-1217.
- Lehner, A., Riedel, K., Rattei, T., Ruepp, A., Frishman, D., Breeuwer, P., Diep, B., Eber, L. y Stephan, R. (2006). Molecular characterization of the  $\alpha$ -glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism. *Systematic and Applied Microbiology*, 9, pp: 609-625.
- Lehner, A., Tall, B. D., Fanning, S. y Srikumar, S. (2018). *Cronobacter* spp. Opportunistic foodborne pathogens: an update on evolution, osmotic adaptation and pathogenesis. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5 (2), pp: 97-105.
- Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Pekard-Amenitsch, S., Forsythe, S.J., Cormican, M., Mach, R.L. y EUCRONI Study Group (2019). Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 25 (3), pp: 515-522.
- Li, Y., Yu, H., Jiang, H., Jiao, Y., Zhang, Y. y Shao, J. (2017). Genetic diversity, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Cronobacter* spp. recovered from spices and cereals. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2567.
- Lindquist, L. y Vapalahti, O. (2008). Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 31, 371 (9627), pp: 1861-1871.
- Linn, K.Z., Furuta, M., Nakayama, M., Masuda, Y., Honjoh, K.I. y Miyamoto, T. (2021). Characterization and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chicken and pork. *International Journal of Food Microbiology*, 360: 109440.
- Lou, X., Yu, H., Wang, X., Qi, J., Zhang, W., Wang, H., Si, G., Song, S., Huang, C., Liu, T., Zheng, W. y Fang, Z. (2019). Potential reservoirs and routes of *Cronobacter* transmission during cereal growing, processing and consumption. *Food Microbiology*, 79, pp: 90-95.
- Lupo, A., Vogt, D., Seiffert, S.N., Endimiani, A. y Perreten, V. (2014). Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. *Journal of Food Protection*, 77 (11), pp: 1976-1981.
- Mari-Almirall, M., Cosgaya, C., Pons, M.J., Nemec, A., Ochoa, Th., Ruiz, J., Roca, I. y Vila, J. (2019). Pathogenic *Acinetobacter* species including the novel *Acinetobacter dijkschoorniae* recovered from market meat in Peru. *International Journal of Food Microbiology*, 305: 108248.
- Marin, C., Lorenzo-Rebenaque, L., Moreno-Moliner, J., Sevilla-Navarro, S., Montero, E., Chinillac, M.C., Jordá, J. y Vega, S. (2021). Multidrug-Resistant *Campylobacter jejuni* on Swine Processing at a Slaughterhouse in Eastern Spain. *Animals*, 11: 1339.
- Mazzantini, D., Calvigioni, M., Celandroni, F., Lupetti, A. y Ghelardi, E. (2021). Spotlight on the Compositional Quality of Probiotic Formulations Marketed Worldwide. *Frontiers in Microbiology*, 12: 693973.
- Mc Connell, M.J., Actis, L. y Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, pp: 130-155.
- Meatherall, B.L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J.D.D. y Laupland, K. (2009). Incidence, Risk Factor, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *The American Journal of Medicine*, 122 (9), pp: 866-873.
- Mena, D. y Gerba, Ch. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 201, pp: 71-115.
- Michalska, M. y Wolf, P. (2015). *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*, 6: 963.
- Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., Alonso, M.P., Llovo, J., Bernárdez, M.I., Blanco, J.E., Blanco, M. y Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International Microbiology*, 14, pp: 121-141.
- Mora, A., López, C., Dhabhi, G., López-Beceiro, A.M., Fidalgo, L.E., Díaz, E.A., Martínez-Carrasco, C., Mamani, R., Herrera, A., Blanco, J.E., Blanco, M. y Blanco, J. (2012). Seropathotypes, Phylogroups, *Stx* Subtypes, and Intimin Types of Wildlife-Carried, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains with the Same Characteristics as Human-Pathogenic Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (8), pp: 2578-2585.

- Moran-Gilad, J., Adler, A., Schwartz, D., Navon-Venezia, S. y Carmeli, Y. (2014). Laboratory evaluation of different agar media for isolation of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33, pp: 1909-1913.
- Mullane, N., Healy, B., Meade, J., Whyte, P., Wall, P.G. y Fanning, S. (2008). Dissemination of *Cronobacter* spp. [*Enterobacter sakazakii*] in a powdered milk protein manufacturing facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (19), pp: 5913-5917.
- Mullane, N.R., Whyte, P., Wall, P.G., Quinn, T. y Fanning, S. (2007). Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. *International Journal of Food Microbiology*, 116 (1), pp: 73-81.
- Nair, A.S. (2018). Minocycline: The second important antimicrobial in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 34 (1): 140-141.
- Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (1), pp: 142-201.
- Norberg, S., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C., Fitzgerald, G.F. y Cotter, P.D. (2012). *Cronobacter* spp. in powdered infant formula. *Journal of Food Protection*, 75 (3), pp: 607-620.
- Ocejo, M., Oporto, B. y Hurtado, A. (2019). Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Cattle and Sheep in Northern Spain and Changes in Antimicrobial Resistance in Two Studies 10-years Apart. *Pathogens*, 8, pp: 98.
- Odeyemi, O.A. y Sani, N.A. (2019). Antibiotic resistance, putative virulence factors and curli fimbriation among *Cronobacter* species. *Microbial Pathogenesis*, 136: 103665.
- Oh, S.W., Chen, P.C. y Kang, D.H. (2007). Biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* grown in artificial broth and infant milk formula on plastic surface. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15 (4), pp: 311-319.
- Okorie, P.Ch., Olasupo, N.A., Anike, F.N., Elemo, G.N. e Isikhuemhen, O.S. (2017). Incidence of enteric pathogens in ugba, a traditional fermented food from African oil bean seeds (*Pentaclethra macrophylla*). *International Journal of Food Contamination*, 4: 12.
- Oliveira, M., Ferreira, V., Magalhães, R. y Teixeira, P. (2018). Biocontrol strategies for Mediterranean-style fermented sausages. *Food Research International*, 103, pp: 438-449.
- Oliwa-Stasiak, K., Molnar, C.I., Arshak, K., Bartoszcze, M. y Adley, C.C. (2010). Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *Journal of Applied Microbiology*, 108 (1), pp: 266-273.
- OMS (2020). Organización Mundial de la Salud. *Campylobacter*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter> [acceso: 28-06-22].
- OMS (2022). Organización Mundial de la Salud. Breastfeeding. Disponible en: [https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_1) [acceso: 28-06-22].
- Oporto, B., Esteban, J.I., Aduriz, G., Juste, R.A. y Hurtado, A. (2007). Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (4), pp: 977-984.
- Oren, A. y Garrity, G.M. (2014). Proposal to change General Consideration 5 and Principle 2 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, pp: 309-310.
- Otero, V. (2014). Incidencia, comportamiento y control de tipos patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en leche y queso de oveja [tesis doctoral]. Universidad de León. Disponible en: [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3670/tesis\\_b37a5d.PDF?sequence=1&isAllowed=y](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3670/tesis_b37a5d.PDF?sequence=1&isAllowed=y) [acceso: 28-06-22].
- Park, S. y Sauer, K. (2021). SagS and its unorthodox contributions to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Biofilm*, 3: 100059.
- Passet, V. y Brisse, S. (2015). Association of tellurite resistance with hypervirulent clonal groups of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53, pp: 1380-1382.
- Patrick, M.E., Mahon, B.E., Greene, S.A., Rounds, J., Cronquist, A., Wymore, K., Boothe, E., Lathrop, S., Palmer, A.

- y Bowen, A. (2014). Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 20 (9), pp: 1520-1523.
- Pei, X.Y., Yan, L., Zhu, J.H., Li, N., Guo, Y.C., Fu, P., Jia, H.Y., Zhang, X.L., Yang, X.R. y Yang, D.J. (2016). The survey of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in infant and follow-up powdered formula in China in 2012. *Biomedical and Environmental Sciences*, 29 (2), pp: 99-106.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P. y Gilmore, B.F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11 (3), pp: 297-308.
- Peng, K., Wang, Q., Yin, Y., Li, Y., Liu, Y., Wang, M., Qin, S., Wang, Z. y Li, R. (2021). Plasmids shape the current prevalence of tmexCD1-toprJ1 among *Klebsiella pneumoniae* in food production chains. *mSystems*, 6: e00702-21.
- Peña, C., Suarez, C., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez, F. Tubau, F. Oliver, A. y Martínez-Martínez, L. (2013). Effect of adequate single-drug versus combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. A post hoc analysis of a prospective cohort. *Clinical Infectious Diseases*, 57 (2), pp: 208-216.
- Pina-Pérez, M.C., Rodrigo, D. y Martínez, A. (2016). Nonthermal inactivation of *Cronobacter sakazakii* in infant formula milk: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (10), pp: 1620-1629.
- Projahn, M., Von Tippelskirch, P., Semmler, T., Guenther, S., Alter, T. y Roesler, U. (2019). Contamination of chicken meat with extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* during scalding and defeathering of broiler carcasses. *Food Microbiology*, 77, pp: 185-191.
- Proudy, I., Bougle, D., Leclercq, R. y Vergnaud, M. (2008). Tracing of *Enterobacter sakazakii* isolates in infant milk formula processing by BOX-PCR genotyping. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (2), pp: 550-558.
- Rabêlo, C.A., Ricardo, M., Porfirio, J.A., Pimentel, T.C., do Santos Nascimento, J. y de Costa Oliveira, L.E. (2021). Psychrotrophic bacteria in Brazilian organic dairy products: Identification, production of deteriorating enzymes and biofilm formation. *Food Science & Technology, Campinas*, 41 (3), pp: 799-806.
- Rafel, R., Hamze, M., Pallhories, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.L., Dabboussi, F. y Kempf, M. (2015). Extrahuman Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (7), pp: 2359-2367.
- Raimondi, S., Spampinato, G., Macavei, L.I., Lugli, L., Candelieri, F., Rossi, M., Maistrello, L. y Amaretti, A. (2020). Effect of Rearing Temperature on Growth and Microbiota Composition of *Hermetia illucens*. *Microorganisms*, 8 (6): 902.
- Rangaraju, V., Malla, B.A., Milton, A.A.P., Madesh, A., Madhukar, K.B., Kadwalia, A., Vinodhkumar, O.R, Kumar, M.S. y Dubal, Z.B. (2022). Occurrence, antimicrobial resistance and virulence properties of thermophilic *Campylobacter coli* originating from two different poultry settings. *Gene Reports*, 27: 101618.
- Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J.E., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R. y Alonso, J.M. (2006). Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 107, pp: 212-217.
- Rios, E.A. (2018). Incidencia y control de tipos patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en leche de vaca y quesos derivados en Castilla y León [tesis doctoral]. Universidad de León. Disponible en: <https://buleria.unileon.es/handle/10612/7957> [acceso: 28-06-22].
- Rishi, A., Huff, K., Han, S., Mai, T., Zhao, Y., Jang, Y., Lorr, J. y Samadpour, M. (2021). Validation of the Atlas™ *Campylobacter* Detection Assay: AOAC Performance Tested Method SM 032101. *Journal of AOAC International*, 104 (6), pp: 1620-1633.
- Rodrigues, C., Hauser, K., Cahill, N., Ligowska-Marzeta, M., Centorotola, G., Cornacchia, A., García Fierro, R., Haenni, M., Møller Nielsen, E., Piveteau, P., Barbier, E., Morris, D., Pomillo, F. y Brisse, S. (2022). High Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* in European Food Products: a Multicentric Study comparing Culture and Molecular detection Methods. *Microbiology Spectrum*, 10 (1): e02376-21.
- Rodrigues, C., Passet, V., Rakotondrasoa, A. y Brisse, S. (2018). Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Kleb-*

- siella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Frontiers in Microbiology*, 9: 3000.
- Rónai, Z. y Egyed, L. (2020). Survival of Tick-Borne Encephalitis Virus in Goat Cheese and milk. *Food and Environmental Virology*, 12, pp: 264-268.
- Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., Lozano, C., López, M., Chichón, G., Torres, C. y Sáenz, Y. (2021). Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypic Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 12626.
- Russo, A., Gavaruzzi, F., Ceccarelli, G., Borrazzo, C., Oliva, A., Alessandri, F., Magnanimiti, E., Pugliese, F. y Venditti, M. (2022). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in COVID-19 patients hospitalized in intensive care unit. *Infection*, 50, pp: 83-92.
- Sabota, J.M., Hoppes, W.L., Zieglar, J.R., DuPont, J., Mathewson, J. y Rutecki, G.W. (1998). A new variant of food poisoning: enteroinvasive *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* sepsis from a contaminated hamburger. *American Journal of Gastroenterology*, 93 (1), pp: 118-119.
- Sánchez, S., García Cenoz, M., Martín, C., Beristain, X., Llorente, M.T. y Herrera-León, S. (2014). Cluster investigation of mixed O76:H9 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* infection in a Spanish household. *Epidemiology and Infection*, 142, pp: 1029-1033.
- Sánchez, S., Martínez, R., Rey, J., García, A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Herrera-León, S., Echeita, A. y Alonso, J.M. (2010). Pheno-genotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Veterinary Microbiology*, 142 (3-4), pp: 445-449.
- Sani, N.A. y Odeyemi, O.A. (2015). Occurrence and prevalence of *Cronobacter* spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis. *SpringerPlus*, 4: 545.
- Schaber, J.A., Carty, N.L., McDonald, N.A., Graham, E.D., Cheluvappa, R., Griswold, J.A. y Hamood, A.N. (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 53, pp: 841-853.
- Schwaiger, K., Hölzel, C.H. y Bauer, J. (2011). Detection of the macrolide-efflux protein A gene *mef(A)* in *Enterococcus faecalis*. *Microbial Drug Resistance*, 17 (3), pp: 429-432.
- Soliman, A.M., Nariya, H., Tanaka, D., Yu, L., Hisatsune, J., Kayama, S., Kondo, K., Sugai, M., Shimamoto, T. y Shimamoto, T. (2021). Vegetable derived carbapenemase-producing high-risk *Klebsiella pneumoniae* ST15 and *Acinetobacter baumannii* ST2 clones in Japan: coexistence of blaNDM-1, blaOXA-66, blaOXA-72, and an AbaR4-like resistance island in the same sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 87: e02166-20.
- Sordé, R., Pahissa, A. y Rello, J. (2011). Management of refractory *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Infection and Drug Resistance*, 4, pp: 31-41.
- Souli, M., Galani, I. y Giamarellou, H. (2008). Emergence of Extensively Drug-Resistant and pandrug-resistant Gram-Negative Bacilli in Europe. *Eurosurveillance*, 13 (47): 19045.
- Stephan, R., Grim, C.J., Gopinath, G.R., Mammel, M.K., Sathyamoorthy, V., Trach, L.H., Chase, H.R., Fanning, S. y Tall, B.D. (2014). Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (10), pp: 3402-3410.
- Stingl, K., Heise, J., Thieck, M., Wulsten, I.F., Pacholewicz, E., Iwobi, A.N., ... y Huber, I. (2021). Challenging the "gold standard" of colony-forming units-Validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses. *International Journal of Food Microbiology*, 359: 109417.
- Strydom, A., Cawthorn, D.M., Cameron, M. y Withuhn, R.C. (2012). Species of *Cronobacter* - a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *International Dairy Journal*, 27, pp: 3-12.
- Strysko, J., Cope, J.R., Martin, H., Tarr, C. y Bowen, A. (2020). Food safety and invasive *Cronobacter* infections

during early infancy, 1961–2018. *Emerging Infectious Diseases*, 26 (5), pp: 857-865.

- Tang, Y., Ali, Z., Zou, J., Jin, G., Zhu, J., Yang, J. y Dai, J. (2017). Detection methods for: *Pseudomonas aeruginosa*: history and future perspective. *RSC Advances*, 7: 1789e51800.
- Tavakol, M., Momtaz, H., Mohajen, P., Shokoohezadez, L. y Tajbakhsh, E. (2018). Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7: 120.
- Thi, M.T.T., Wibowo, D. y Rehm, B.H.A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, pp: 1-25.
- Toh, B.E.W., Paterson, D.L., Kamolvit, W., Zowawi, H., Kwaskoff, D., Sidjabat, H., Wailan, A., Peleg, A.Y. y Huber, Ch.A. (2015). Species identification within *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex using MALDI-TOF MS. *Journal of Microbiological Methods*, 118, pp: 128-132.
- Truchado, P., Gil, M.I., López, C., Garre, A., López-Aragón, R.F., Böhme, K. y Allende, A. (2021). New standards at European Union level on water reuse for agricultural irrigation: Are the Spanish wastewater treatment plants ready to produce and distribute reclaimed water within the minimum quality requirements? *International Journal of Food Microbiology*, 356: 109352.
- UE (2003). Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. DO L 325, de 12 de diciembre de 2003, pp: 31-40.
- Umezawa, K., Asai, S., Ohshima, B., Iwashita, H., Ohashi, M., Sasaki, M., Kaneko, A., Inokuschi, S. y Miyachi, H. (2015). Outbreak of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST219 caused by oral care using tap water from contaminated hand hygiene sinks as a reservoir. *American Journal of Infection Control*, 43, pp: 1249-1251.
- Valentini, M., González, D., Mavridou, D.A. y Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptative pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*, 41, pp: 15-20.
- Van del Kolk, J.H., Endimiani, A., Graubner, C., Gerber, V. y Perreten, V. (2019). *Acinetobacter* in veterinary medicine with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, pp: 59-71.
- Van der Plas, M.J., Bhongir, R.K., Kjellström, S., Siller, H., Kasetty, G., Mörgelin, M. y Schmidtchen A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses. *Nature Communications*, 7: 11567.
- Van Kregten, E., Westerdaal, N.A.C. y Willers, J.M.N. (1984). New, simple medium for selective recovery of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from human feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, pp: 936-941.
- Van Loon, K., Voor in't Holt, A. y Vos, M.C. (2018). A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62 (1): e01730-17.
- Vasconcellos, L., Carvalhob, C.T., Tavares, R.O., Medeiros, V.M., Rosas, C.O., Silvaa, J.N., Lopes, S.M.R., Forsythed, S.J. y Brandão, M.L.L. (2018). Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. *Food Research International*, 107, pp: 353-359.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C. y Manaia, C.M. (2017). Ubiquitous and persistent proteobacteria and other gram-negative bacteria in drinking water. *Science of Total Environment*, 586, pp: 1141-1149.
- Vojkowska, H., Karpiskova, R., Orieskova, M. y Drahovska, H. (2016). Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 217, pp: 130-136.
- Walia, K. y Farber, J.M. (2018) Qualitative risk assessment of cricket powder to be used to treat undernutrition in infants and children in Cambodia. *Food Control*, 92, pp: 169-182.
- Wallenhammar, A., Lindqvist, R., Asghar, N., Gunaltay, S., Fredlund, H., Davidsson, Å., Andersson, S., Överby, A.K. y Johansson, M. (2020). Revealing new tick-borne encephalitis virus foci by screening antibodies in sheep milk. *Parasites Vectors*, 13: 185.

- Wang, L., Liu, T., Liu, L., Liu, U.Y. y Wu, X. (2022a). Impacts of chitosan nanoemulsions with thymol or thyme essential oil on volatile compounds and microbial diversity of refrigerated pork meat. *Meat Science*, 185, 108706.
- Wang, Y., Wang, Z., Han, Q., Xie, Y., Zhou, H., Zhou, K., Li, X. y Xu, B. (2022b). Comprehensive insights into the evolution of microbiological and metabolic characteristics of the fat portion during the processing of traditional Chinese bacon. *Food Research International*, 155: 110987.
- Weiser, R., Donoghue, D., Weightman, A. y Mahenthiralingam, E. (2014). Evaluation of five selective media for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a strain panel from clinical, environmental and industrial sources. *Journal of Microbiological Methods*, 99, pp: 8-14.
- Wright, C., Kominos, S.D. y Yee, R.B. (1976). *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Applied and Environmental Microbiology*, 31 (3), pp: 453-454.
- Wu, M. y Li, X. (2015). Chapter 87 - *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition), 3, pp: 1547-1564.
- Wu, N., Dai, J., Gou, M., Li, J., Zhou, X., Li, F., Gao, Y., Qu, H., Lu, H., Jin, J., Li, T., Shi, L., Wu, Q., Tan, R., Zhu, M., Yang, L., Ling, Y., Xing, S., Zhang, J., Yao, B., Le, S., Gu, J., Qin, J., Li, J., Cheng, M., Tan, D., Li, L., Zhang, Y., Zhu, Z., Cai, J., Song, Z., Guo, X., Chen, Li-K. y Zhu, T. (2021). Pre-optimized phage therapy on secondary *Acinetobacter baumannii* infection in four critical COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*, 10 (1), pp: 612-618.
- Wynants, E., Crauwels, S., Verreth, C., Gianotten, N., Lievens, B., Claes, J. y Van Campenhout, L. (2018). Microbial dynamics during production of lesser mealworms (*Alphitobius diaperinus*) for human consumption at industrial scale. *Food Microbiology*, 70, pp: 181-191.
- Wynants, E., Frooninckx, L., Crauwels, S., Verreth, C., De Smet, J., Sandrock, C., Wohlfahrt, J., Van Schelt, J., Depraetere, S. y Lievens, B. (2019). Assessing the Microbiota of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) Reared on Organic Waste Streams on Four Different Locations at Laboratory and Large Scale. *Microbial Ecology*, 77 (4), pp: 913-930.
- Wyres, K.L., Lam, M.M.C. y Holt, K.E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18 (6), pp: 344-359.
- Xu, J.G., Huang, X.N., Meng, J., Chen, J.Y. y Han, B.Z. (2022). Characterization and comparison of the bacterial community on environmental surfaces through a fresh-cut vegetables processing line in China. *Food Research International*, 155: 111075.
- Zhang, R., Wang, Y., Liu, Z., Li, J., Yin, W., Lei, L., Wu, C. y Shen, J. (2015). Characterization of NDM-1-producing carbapenemase in *Acinetobacter* spp and *E. coli* isolates from diseased pigs. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2 (3), pp: 223-229.
- Zhang, S., Xu, X., Wu, Q. y Zhang, J. (2013). Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water by loop-mediated isothermal amplification. *European Food Research and Technology*, 236, pp: 209-215.
- Zhang, S., Yang, G., Ye, Q., Wu, Q., Zhang, J. y Huang, Y. (2018). Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Retail Foods in China. *Frontiers in Microbiology*, 9: 289.
- Zhu, J., Wang, T., Liang, C. y Du, H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12: 642484.

