

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RESISTOMA Y VIRULOMA DE MELÓN (*Cucumis melo* L) Y SU AMBIENTE
EN HUERTAS DE LA REGIÓN DE PAILA COAHUILA.**

POR:

Q.B.P. JANETH PÉREZ GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Junio 2018

**Resistoma y Viruloma de melón (*Cucumis melo* L) y su ambiente en huertas de la
Región de Paila Coahuila.**

Comité de Tesis

Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Presidente

Dr. Eduardo Franco Frías

Secretario

Dr. José Santos García Alvarado

Primer Vocal

Dr. José Ángel Merino Mascorro

Segundo Vocal

Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña

Tercer Vocal

**RESISTOMA Y VIRULOMA DE MELÓN (*Cucumis melo* L) Y SU AMBIENTE
EN HUERTAS DE LA REGIÓN DE PAILA COAHUILA.**

Dirección de tesis

Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Presidente

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca para permitirme continuar con mis estudios de maestría (CVU 579754).

A Dios por acompañarme a lo largo de mi vida y permitirme seguir con mis estudios profesionales.

A mis padres, hermanos y familia por su apoyo moral e incondicional en cada momento y darme la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Alam, por su invaluable apoyo que desde los inicios de mi carrea hasta este momento han sido muy importantes para mí.

Al Dr. Santos y Dra. Norma por su confianza, apoyo y consejos durante toda mi formación y estancia en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos. Gracias por permitirme formar parte de su equipo de investigación.

A todos los que forman y formaron parte del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos.

A mis maestros y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por las enseñanzas y conocimientos adquiridos, los cuales siempre se encontrarán presentes en mi vida.

DEDICATORIAS

A mis padres, hermanos y familia.

A mi novio, Alam. Gracias por tu apoyo incondicional

ÍNDICE

Portada.....	I
Hoja de firmas.....	II
Agradecimientos.....	IV
Dedicatorias.....	V
Índice.....	VI
Índice de tablas.....	IX
Índice de figuras.....	XI
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XII
Resumen.....	XIV
Abstract.....	XV
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	2
2.2. Microorganismos indicadores.....	2
2.3. Contaminación de frutas y hortalizas.....	3
2.3.1. Contaminación de melón.....	4
2.3.1.1. Agua de riego.....	5
2.3.1.2. Fertilizantes orgánicos.....	5
2.3.1.3. Suelo.....	5
2.4. Microorganismos patógenos en melón.....	6
2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	6
2.4.1.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	7
2.4.1.2. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	8
2.4.1.3. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	8
2.4.1.4. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	8
2.4.1.5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	9
2.4.1.6. <i>Escherichia coli</i> adherente difusa (DAEC).....	9
2.4.1.7. <i>Escherichia coli</i> adherente invasiva (AIEC).....	9
2.4.2. <i>Salmonella</i> spp.....	10

2.4.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.4.4. <i>Enterococcus</i> spp.....	12
2.5. Resistoma.....	13
2.5.1. Transferencia horizontal de genes.....	14
2.5.1.1. Transformación.....	14
2.5.1.2. Transducción.....	15
2.5.1.3. Conjugación.....	15
2.5.2. Resistencia a antibióticos en alimentos.....	16
2.5.3. Uso de antibióticos en agricultura.....	17
2.5.4. Reservorios de genes.....	17
2.5.5. Grupos de antibióticos de importancia en áreas agrícolas.....	18
2.5.5.1. β -lactámicos.....	18
2.5.5.2. Fluoroquinolonas.....	19
2.5.5.3. Tetraciclinas.....	20
2.5.5.4. Macrólidos.....	20
2.5.5.5. Sulfonamidas.....	21
2.5.5.6. Colistina.....	21
2.5.6. Factores asociados en la diseminación de genes de resistencia	22
2.5.6.1. Integrones.....	22
2.5.6.2. Plásmidos.....	23
2.6. Viruloma.....	24
2.6.1. Transferencia de genes de virulencia.....	25
2.7. Relación entre viruloma y resistoma.....	26
3. Justificación.....	27
4. Hipótesis.....	28
5. Objetivos.....	29
5.1. Objetivo general.....	29
5.2. Objetivos específicos.....	29
6. Material y métodos.....	30
6.1. Recolección de muestras.....	30

6.1.1. Recolección de muestras: melón.....	30
6.1.1.1. Lavado de melones.....	30
6.1.2. Recolección de muestras: agua.....	31
6.1.3. Recolección de muestras: manos.....	31
6.2. Procesamiento de muestras.....	32
6.3. Determinación del resistoma y viruloma.....	32
6.3.1. Filtración por membrana.....	32
6.3.2. Extracción de ADN genómico del microbioma del melón.....	32
6.3.2.1. Detección de genes por PCR punto final.....	33
6.4. Análisis estadístico.....	38
7. Resultados.....	39
7.1. Perfil de resistencia a antibióticos asociado al ambiente agrícola de melón.....	40
7.2. Perfil de virulencia asociado al ambiente agrícola de melón.....	46
7.3. Correlación de genes analizados en muestras del ambiente agrícola de melón.....	52
7.3.1. Genes de resistencia a antibióticos.....	52
7.3.2. Genes de virulencia.....	56
8. Discusión.....	60
9. Conclusiones.....	64
10. Bibliografía.....	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes constitutivos para la determinación del microbioma bacteriano asociado al ambiente agrícola de melón.....	33
Tabla 2. Genes de resistencia a antibióticos (A) y factores de virulencia (B) que se utilizaron para la determinación del resistoma y viruloma del microbioma bacteriano asociado al ambiente agrícola de melón.....	34
Tabla 2 (A). Genes de resistencia a antibióticos.....	34
Tabla 2 (B). Genes de factores de virulencia.....	36
Tabla 3 Características y tipo de muestra para cada una de las huertas de melón visitadas	39
Tabla 4. Total de muestras positivas (%) para genes asociados a resistencia de antibióticos para cada una de las muestras analizadas de diferentes puntos en el ambiente agrícola de melón.....	41
Tabla 5. Total de muestras positivas (%) para genes asociados a factores de virulencia para cada una de las muestras analizadas de diferentes puntos en el ambiente agrícola de melón.	47
Tabla 6. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a la resistencia a antibióticos en el total de muestras del ambiente agrícola de melón.....	53
Tabla 7. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a resistencia a antibióticos analizados en muestras de melón. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor..	54
Tabla 8. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a resistencia a antibióticos analizados en muestras de manos de pizzadores. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.....	54
Tabla 9. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a resistencia a antibióticos analizados en muestras de agua (irrigación y fuente). Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.....	55

Tabla 10. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a resistencia a antibióticos analizados en muestras de agua de irrigación. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor..... 55

Tabla 11. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a resistencia a antibióticos analizados en muestras de agua de fuente. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor..... 55

Tabla 12. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia en el total de muestras del ambiente agrícola de melón.....57

Tabla 13. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia analizados en muestras de melón. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor..58

Tabla 14. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia analizados en muestras de manos de pizcadores. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.....58

Tabla 15. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia analizados en muestras de agua (irrigación y fuente). Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.....59

Tabla 16. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia analizados en muestras de agua de fuente. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.....59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de genes asociados a la resistencia a antibióticos en 200 muestras procedentes del ambiente agrícola de melón (melón, manos de pizcadores, agua de irrigación y agua de fuente).....	42
Figura 2. Distribución de genes asociados a resistencia a antibióticos en muestras de melón.....	43
Figura 3. Distribución de genes asociados a resistencia a antibióticos en muestras de manos de pizcadores.....	43
Figura 4. Distribución de genes asociados a resistencia a antibióticos en muestras de agua (irrigación y fuente).....	44
Figura 5. Distribución de genes asociados a resistencia a antibióticos en muestras de agua de irrigación.....	44
Figura 6. Distribución de genes asociados a resistencia a antibióticos en muestras de agua de fuente.....	45
Figura 7. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en 200 muestras procedentes del ambiente agrícola de melón (melón, manos de pizcadores, agua de irrigación y agua de fuente).....	48
Figura 8. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de melón.....	49
Figura 9. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de manos de pizcadores.....	49
Figura 10. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua (irrigación y fuente).....	50
Figura 11. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua de irrigación.....	50
Figura 12. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua de fuente.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

Símbolo	Definición
%	Porcentaje
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CDC	Centro de Control de Enfermedades
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESBL	β -lactamasas de espectro extendido
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
GITC	Isotiocianato de guanidina
M	Molar
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
oz	onzas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PMQR	Plásmidos de resistencia a quinolonas
ppm	Partes por millón
QS	Quorum Sensing
r	R de Pearson
s	segundos
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonia por gramo
UV	Luz ultravioleta
X ²	Chi-cuadrada

RESUMEN.

Actualmente, existe interés en el aumento del uso de antibióticos en agricultura, ya que puede conllevar el riesgo de adquisición de genes de resistencia por bacterias adaptadas a estos ambientes, las cuales, aun siendo comensales o no patógenas, se encuentran como reservorios y con riesgo de diseminar genes por vía horizontal a microorganismos patógenos. Así mismo, se ha determinado que la regulación del conjunto de genes de resistencia a antibióticos (resistoma), encontrados en bacterias presentes en alimentos, posee una relación con la presencia y regulación de la mayoría de los genes de virulencia (viruloma), así como de su transferencia.

En este estudio, se evaluó el resistoma y el viruloma del microbioma bacteriano y de bacterias patógenas de importancia presentes en 200 muestras del ambiente agrícola, 99 de melón (*Cucumis melo* L), 66 de manos de pizcadores, 17 de agua de irrigación y 18 de agua de fuente, obtenidas de tres huertas de melón en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza, México. Cada muestra fue concentrada mediante filtración por membrana y la posterior extracción del ADN total para el análisis del perfil de resistencia a antibióticos y factores de virulencia mediante PCR punto final. Los resultados demostraron mayor frecuencia de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia en las muestras de melón y enjuague de manos de los pizcadores. De acuerdo con el perfil de resistencia a antibióticos, se encontró mayor frecuencia de genes pertenecientes a β -lactámicos (*blaCARB-4*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB*), integrones (*int1*) y fluoroquinolonas (*parE*), mientras que el perfil de virulencia demostró mayor frecuencia de los genes de adhesión, *fimH* de *Escherichia coli*, *ccf* de *Enterococcus faecalis* y de invasión, *invA* de *Salmonella* spp. Las muestras de melón y enjuague de manos mostraron mayor frecuencia de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, lo cual indica la alta necesidad de implementar buenas prácticas de higiene en los manipuladores para prevenir su diseminación y transmisión.

ABSTRACT

The use of antibiotics in agriculture leads to a high risk of antibiotic resistance due to transference of resistance genes. Native bacteria are considered as the main reservoirs of these genes and have potential to disseminate genetic information by horizontal gene transfer (HGT). In addition, studies have concluded that the resistome, defined as the set of all antibiotic resistance genes, correlates with the ability of bacteria to be pathogenic, regulates virulence factors (virulome) and gene dissemination by HGT

In the present study, the resistome and virulome of the bacterial microbiome from 200 agricultural samples were evaluated, corresponding to 99 samples from hole cantaloupe (*Cucumis melo* L), 66 from workers hands, 17 from irrigation water and 18 from source water. All samples were obtained from three different cantaloupe farms in Coahuila de Zaragoza, México. Prior total DNA extraction, each sample was concentrated by membrane filtration. Then, the membranes were treated to analyze the antibiotic resistance and virulence profiles by PCR. The results showed higher frequency of both resistome and virulome genes in samples from cantaloupe and hands rinses. According to the antibiotic resistance profile, the genes associated to β lactam antibiotics (*blaCARB-4*), tetracyclines (*tetA*, *tetB*), class 1 integrons (*int1*) and fluoroquinolones (*parE*) were the most frequent on all samples, while the results from the virulome profile indicate a marked frequency of adhesion (*fimH* and *ccf*) and invasion genes (*invA*). Cantaloupe and worker hands samples showed more abundance of both antibiotic resistance and virulence genes, suggesting that the implementation of good agricultural practices is highly recommended on food handlers to prevent bacterial and gene dissemination.

1. INTRODUCCIÓN

Los brotes asociados al consumo de alimentos han ido en aumento durante los últimos años, por lo cual, se requiere intensificar los puntos de control durante toda la cadena de producción y su comercialización. Los productos frescos, como frutas y vegetales, son susceptibles a la contaminación por patógenos durante toda la cadena de producción hasta su distribución, por lo que su consumo es considerado como de riesgo.

El melón (*Cucumis melo* L.), es un producto que durante su cosecha se encuentra en contacto directo con agua superficial y suelo, representando estas, las vías principales de contaminación por bacterias patógenas como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, y *Listeria monocytogenes*, entre otros.

En la actualidad, el uso de antibióticos en agricultura ha permitido la selección de bacterias no patógenas y patógenas, que son resistentes a estos antibióticos, convirtiéndose en reservorios de estos genes, transfiriéndose a bacterias del microbioma del suelo y hortalizas, por procesos como la transferencia horizontal de genes. Esta acción, no solo origina la adquisición de genes de resistencia a antibióticos y su posterior transmisión, sino que adicionalmente su presencia se encuentra altamente relacionada con la regulación y transferencia de genes de virulencia.

La relación entre la resistencia a antibióticos y la virulencia de los microorganismos presentes, ha permitido direccionar hacia áreas de investigación sobre el conocimiento de características presentes en ciertas bacterias (patógenas y no patógenas), enfocándose en el análisis genómico del conjunto de genes responsables de la resistencia y virulencia que se presenta en dicho entorno.

Es por esto que en el presente trabajo se determinó el resistoma (perfil genético de resistencia a antibióticos) y viruloma (perfil genético de factores de virulencia) de bacterias asociadas al microbioma del melón (*Cucumis melo* L.) y su ambiente de producción.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las ETAs son causadas por contaminación de los productos durante su producción y/o proceso, donde los microorganismos indeseables no son removidos por procesos de control como la cocción (Veras *et al.* 2008). Esto ha conllevado a una gran cantidad de enfermedades, contabilizándose tan solo en Estados Unidos entre los años 2001 y 2010, alrededor de 25,000 enfermedades y 600 brotes por consumo de frutas y verduras contaminadas (Heredia *et al.* 2016).

Los vegetales que han mostrado mayor incidencia como causantes de brotes, dentro de Estados Unidos, Canadá y México, incluyen a melón, tomate y chile jalapeño, que al ser consumidos generalmente crudos o sin una limpieza exhaustiva, se reportan como principales vehículos para la transmisión y causa de ETAs (Heredia *et al.* 2016).

Se han reportado más de 200 agentes químicos, físicos o microbianos que pueden causar enfermedades al ser ingeridos; en donde las bacterias, virus, parásitos y priones han sido de gran importancia durante los últimos años. Dentro de los microorganismos de importancia se encuentra a *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, Rotavirus y Norovirus, los cuales representan los patógenos más comúnmente involucrados en contaminación de alimentos (Newell *et al.* 2010).

2.2. Microorganismos indicadores

La baja concentración y no uniformidad en la distribución de los patógenos en alimentos como frutas y verduras, limita su detección y/o cuantificación, por lo cual históricamente se ha propuesto y utilizado con relativo éxito, grupos de microorganismos conocidos como indicadores de contaminación, los cuales son utilizados para estimar la calidad e inocuidad del producto, ya que presentan características de crecimiento mejores o semejantes a

patógenos prediciendo entonces el riesgo de la presencia de microorganismos indeseables (Heredia *et al.* 2016).

Entre los géneros bacterianos considerados como indicadores de contaminación se encuentran, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Aeromonas* y *Serratia*; caracterizándose todos ellos, por ser Gram negativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, fermentadores de lactosa, productores de gas y generalmente móviles (Feng *et al.* 2002; Heredia *et al.* 2016).

Aun cuando se ha reportado que este grupo de microorganismos se encuentra presente en alta concentración, principalmente en alimentos que tuvieron contacto con heces o suelo previamente contaminado (Ray y Bhunia 2014), su presencia no siempre tiene correlación con la presencia o ausencia de bacterias patógenas, por lo que se han encontrado otras alternativas tales como miembros del género *Bacteroides*, los cuales por su limitación a encontrarse únicamente en la microflora intestinal, su incapacidad de proliferar adecuadamente en el ambiente y a que poseen secuencias específicas del huésped, hacen de estos apropiados para el conocimiento y trazabilidad de la fuente de contaminación (Ravaliya *et al.* 2014)

2.3. Contaminación de frutas y hortalizas

El consumo de frutas, verduras y productos frescos ha ido en aumento durante los últimos años, principalmente por sus beneficios para la salud (Gómez-Govea *et al.* 2012; Monaghan y Hutchison 2016); sin embargo, la presencia de bacterias patógenas en estos alimentos ha resultado en distintos brotes, los cuales llegaron a causar un 46% de mortalidad en personas hospitalizadas durante el periodo de 2007 al 2011 en Europa (Uyttendaele *et al.* 2015). La OMS, ha clasificado ciertos productos en los cuales el mantenimiento de su inocuidad es de alta prioridad, encontrándose entre estos a vegetales como lechuga, tomates, espinacas, melones y chiles (FAO/WHO 2008); en donde se ha establecido que *Shigella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, norovirus, virus de

la hepatitis A, *Cyclospora cayetanensis* y *Cryptosporidium* constituyen los principales microorganismos causantes de ETAs en estos productos (Uyttendaele *et al.* 2015).

Está bien documentado que la contaminación de frutas y hortalizas por microorganismos patógenos se puede dar en diferentes puntos de su cadena de producción, desde el campo hasta su venta y consumo (Uyttendaele *et al.* 2015; Allen *et al.* 2016).

2.3.1. Contaminación de melón

En la actualidad, el consumo de frutas y verduras ha ido en aumento considerablemente, reconociéndose como un factor importante para tener una vida saludable por la alta fuente de energía, minerales, vitaminas y fibra que estos poseen (Al-Kharousi *et al.* 2016). El melón (*C. melo* L.), es una fruta consumida en altas cantidades (Bowen *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2015), desafortunadamente se ha visto relacionado con brotes importantes, como el causado por *Salmonella enterica* serotipo Poona, entre 2000 y 2002 (Bowen *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2015) y *L. monocytogenes* en el 2011 (Walsh *et al.* 2015; Dolan *et al.* 2018). Debido a la alta incidencia de diferentes serotipos de *Salmonella* spp. en estos frutos, se han reconocido a los melones como naturalmente contaminados con este microorganismo (FDA 2015).

Generalmente, los microorganismos no tienen la capacidad de proliferar favorablemente en la superficie de frutas y vegetales, ya que no poseen las enzimas necesarias para la degradación de barreras externas que las protegen, sin embargo, esta definición excluye productos como el melón, ya que la mayoría de los brotes e infecciones reportados por el consumo de este producto, se han producido por contaminación superficial (FDA 2015).

La presencia de microorganismos contaminantes de la superficie del melón se ha relacionado principalmente con el área de producción, en donde se han identificado las siguientes fuentes de contaminación:

2.3.1.1. Agua de riego

La ausencia de agua potable para uso en agricultura ha llevado al incremento del uso de aguas residuales para irrigación de cultivos de frutas y vegetales (Balkhair 2016), en donde, al no ser tratadas adecuadamente, se puede encontrar la presencia de bacterias entéricas, virus, protozoarios y helmintos (Marine 2015). *S. enterica* y *E. coli* son las principales bacterias patógenas reportadas en aguas llegando a alcanzar hasta el 15%.

La forma de riego para cultivos de frutas y vegetales es generalmente mediante sistemas rociadores, en donde se tendrá un contacto directo con el producto (Marine 2015).

Sin embargo, el factor de riesgo durante el cultivo de melones se encuentra principalmente es la manera en que la planta y su fruto crecen ya que el melón se encuentra en contacto directo con suelo, agua superficial y factores ambientales (FAO 2011).

2.3.1.2. Fertilizantes orgánicos

Los fertilizantes orgánicos, basados en estiércol de animales, son considerados reservorios de bacterias resistentes a antibióticos, genes de resistencia y virulencia, los cuales pueden afectar directamente al humano por el consumo de frutas y vegetales contaminados (Udikovic-Kolic *et al.* 2014).

La aplicación de fertilizantes en el suelo de cultivo incrementa la variedad de bacterias resistentes en este ambiente, las cuales generalmente se encuentran como nativas y no patógenas para el humano, sin embargo, son las que principalmente pueden llevar a cabo transferencia horizontal de genes provenientes de bacterias patógenas (Udikovic-Kolic *et al.* 2014).

2.3.1.3. Suelo

El suelo se ha encontrado como uno de los reservorios principales de bacterias patógenas, así como de compuestos antimicrobianos y genes asociados a resistencia y virulencia. A

través de bacterias comensales, se pueden adquirir genes de virulencia o resistencia de ellos mediante transferencia horizontal (Johnston y Jaykus 2004).

Así mismo, se ha reportado que patógenos como *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. enterica* pueden sobrevivir en esta matriz durante 3, 8 y 23 semanas, respectivamente (FAO 2011) dependiendo de las condiciones ambientales que se presenten, así como las prácticas de higiene y saneamiento que se practiquen en el área de trabajo (Wang *et al.* 2014).

2.4. Microorganismos patógenos en melón

Durante los últimos años, el consumo de melón se ha asociado a brotes provocados por bacterias patógenas como *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, las cuales entran en contacto con este producto en cualquier punto desde la producción hasta su distribución y consumo (Fu *et al.* 2017).

La estructura en forma de malla o red y su textura rugosa, son de los principales factores asociados a la persistencia y crecimiento bacteriano en la superficie de este fruto (Ukuku *et al.* 2015). Adicionalmente, la presencia de estructuras de superficie celular como flagelos, fimbrias y la producción de exopolisacárido, aumentan su adhesión (Ukuku *et al.* 2016).

2.4.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli, es una bacteria descubierta en 1885 por Theodor Escherich, llamada originalmente *Bacterium coli*. Es un microorganismo distribuido ampliamente en muchos ambientes, dentro de los cuales se encuentra de forma normal en el intestino delgado de mamíferos incluyendo al humano, en donde ayuda a la síntesis de vitaminas y a la competencia para la adhesión intestinal de bacterias patógenas adquiridas por alimentos (Feng *et al.* 2002; Croxen *et al.* 2013; Gomes *et al.* 2016).

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es bacilo Gram negativo, que no posee la capacidad de formar esporas y generalmente es móvil por la presencia de flagelos polares. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, considerándose como mesofílica; su metabolismo generalmente es anaerobio facultativo y tienen la capacidad de metabolizar por fermentación una gran variedad de azúcares como glucosa y lactosa con producción de ácido y gas (Labbé y García 2001).

Se ha observado un patrón de resistencia en *E. coli* para tetraciclina, ampicilina, estreptomicina y antibióticos del grupo de las tetraciclinas, sulfonamidas, cefalosporinas y β -lactámicos. Igualmente, se ha demostrado la gran habilidad de transferencia de genes entre especies (inter-especies), como a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o a diferentes especies (intra-especies), como *Hafnia alvei*, lo cual ubica a las cepas comensales de *E. coli*, como uno de los reservorios principales de genes de resistencia a antibióticos (Kelly *et al.* 2009).

A pesar de ser un comensal en el intestino de humanos y animales, también se han encontrado cepas patógenas que han sido clasificadas en siete grupos diferentes en base a los factores asociados a invasión, adhesión, necrosis tóxica, toxinas, hemolisinas, citolisinas y producir diferentes patologías: enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), adherencia difusa (DAEC) y adherente invasiva (AIEC) (Croxen *et al.* 2013; Gomes *et al.* 2016; Rehman *et al.* 2017).

2.4.1.1. *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC)

Escherichia coli enteropatogénica (EPEC), se reconoce como el primer patotipo identificado entre 1940-1950 en brotes relacionados con diarrea infantil, siendo uno de los principales patógenos aislados en Latinoamérica y México (Vidal *et al.* 2007; Croxen *et al.* 2013). Pertenece al grupo de patógenos causantes de lesiones de *adherencia y remoción* (A/E), y es caracterizada por ser no invasiva ni presentar producción de toxina Shiga (Stx); pueden ser termolábiles (LT) y termoestables (ST), sus patrones de adhesión

son generados por la expresión del gen *bfp* (Croxen *et al.* 2013). Prolifera principalmente durante los meses de julio a septiembre, transmitiéndose entre hospederos por vía fecaloral (Newell *et al.* 2010), sin embargo, puede encontrarse, en menor cantidad, contaminando alimentos y agua, presentando una dosis infectiva de 10^8 a 10^{10} células (Croxen *et al.* 2013).

2.4.1.2. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC), es conocida igualmente como *E. coli* productora de Shiga toxina (Stx) (STEC), codificada en los genes *stx*₁ y *stx*₂. Aun cuando se han identificado más de 400 serotipos, no todos se han encontrado con implicaciones en la salud del humano. Estas se caracterizan por causar desde diarrea leve a hemorrágica y secuelas como el conocido Síndrome Urémico Hemolítico (HUS). Dentro de los serotipos conocidos para las STEC, se encuentra *E. coli* O157:H7 (Croxen *et al.* 2013), de la cual la dosis infectiva se estima entre 10 a 100 UFC (Leonard *et al.* 2016). Además del serotipo O157:H7, se han reconocido diversos serotipos conocidos como STEC no-O157, los cuales se han reportado asociados también con enfermedades en humanos (Leonard *et al.* 2016).

2.4.1.3. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC), comparte características bioquímicas, genéticas y de virulencia con *Shigella* teniendo diferencias en su secuencia del 1.12%. Son no móviles, son lisina descarboxilasa negativa y no fermentadores de lactosa. Se transmite entre hospederos por vía fecal-oral o por ingestión de alimentos o agua contaminada, teniendo una dosis infectiva de 10^6 células, sin embargo, no se han reportado brotes importantes en donde EIEC sea la causa (Croxen *et al.* 2013; Feng *et al.* 2016).

2.4.1.4. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), puede ser aislada de pacientes sintomáticos y asintomáticos, con una alta tasa de mortalidad en niños. Es identificada principalmente

por su capacidad de producción de enterotoxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST) (Kaper *et al.* 2004). Su dosis infectiva para adultos se aproxima a 10^8 células, su transmisión es por vía fecal-oral o ingestión de alimentos o agua contaminada, en la cual puede sobrevivir hasta 3 meses, sin embargo, los manipuladores de alimentos y los pacientes asintomáticos, son reconocidos como principales transmisores (Feng *et al.* 2016).

2.4.1.5. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC), se reconoce por ser el agente causal de la diarrea del viajero, así como ser causante del brote del año 2011 en Alemania por la cepa híbrida (EAEC/EHEC), *E. coli* O104:H4 (Delannoy *et al.* 2012; Croxen *et al.* 2013). Su transmisión se debe principalmente al consumo de alimentos como ensaladas y salsas, es encontrada en manos de manipuladores de alimentos, siendo la higiene en estos ambientes un factor de gran importancia para evitar la contaminación cruzada (Croxen *et al.* 2013).

2.4.1.6. *Escherichia coli* adherente difusa (DAEC):

Escherichia coli adherente difusa (DAEC), se encuentra asociada a la sintomatología común de diarrea y es persistente en niños de entre 18 meses y 5 años (Croxen *et al.* 2013). Sin embargo, es considerada como un patotipo único con características diferentes que se caracteriza por presentar patrones de difusión en la adherencia a células HEp-2 e inducir el desarrollo de extensiones celulares que permiten su internalización a la célula blanco (Kaper *et al.* 2004; Croxen *et al.* 2013). Estos patrones de adhesión se deben principalmente a la presencia de la fimbria tipo 1 codificada por el gen fimH la cual permite su adhesión al epitelio intestinal del huésped (Croxen *et al.* 2013).

2.4.1.7. *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC)

Escherichia coli adherente invasiva (AIEC), se encuentra implicada como agente causal principal de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), sin embargo, no se reporta la

expresión de factores de virulencia característicos para la inflamación. Se caracteriza por su habilidad de adherirse, invadir y replicarse en células epiteliales y macrófagos (Croxen *et al.* 2013).

2.4.2. *Salmonella* spp.

Salmonella, es una bacteria con morfología bacilar, Gram negativa y considerada el agente causal de la gastroenteritis en humanos, encontrándose a los animales y alimentos como principales reservorios, en donde la principal vía de entrada es mediante contaminación de hortalizas por el uso de fertilizantes orgánicos (Nyenje y Ndip 2013).

Salmonella enterica, es una de las bacterias más comúnmente encontrada como contaminante de frutas y vegetales. Reportándose 245 casos asociados a melón en Estados Unidos, durante el año 1990 (Gautam *et al.* 2014).

Las vías de contaminación con *S. enterica* de los cultivos de frutas y vegetales incluyen principalmente al agua de riego, pero también agua de lluvia, suelo y el uso de fertilizantes; sin embargo, la presencia y persistencia de *Salmonella* se debe en muchos de los casos, a interacciones (sinergismo) que esta bacteria presenta con los microorganismos nativos o patógenos de los cultivos, quienes facilitan la permanencia de *Salmonella* en ese entorno (Gautam *et al.* 2014).

La presencia de una gran variedad de elementos móviles en el genoma de diferentes especies de *Salmonella*, desde islas de patogenicidad hasta transposones conjugativos, han provocado que este género sea identificado como uno de los principales asociados a la transferencia de genes de resistencia y virulencia (Kelly *et al.* 2009).

La conversión lisogénica, mediante bacteriófagos, es uno de los principales métodos por el cual las especies de *Salmonella* adquieren genes de resistencia y virulencia. Así mismo, se ha demostrado la adquisición de genes mediante plásmidos de virulencia, los cuales pueden ser transferidos por conjugación a diferentes especies (Kelly *et al.* 2009).

2.4.3. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, es una bacteria considerada como patógeno facultativo intracelular por su habilidad de internalizarse y replicarse dentro de células no fagocíticas, las cuales permiten su paso a través del epitelio intestinal, circulación sanguínea y placenta, en mujeres embarazadas (Carvalho *et al.* 2014). Se conoce como el agente causal de la listeriosis en humanos, encontrándose ampliamente distribuida en el ambiente, como en suelo, vegetación, aguas residuales, fertilizantes y animales, en donde puede llegar a sobrevivir por varios días o años (Hadjilouka *et al.* 2015).

Ha estado implicada en brotes asociados a alimentos, en donde el consumo de alimentos cárnicos y lácteos son los principales vehículos de transmisión, sin embargo, al encontrar a *L. monocytogenes* asociada a alimentos frescos como frutas y verduras ha producido que su incidencia haya aumentado considerablemente (Hadjilouka *et al.* 2015).

Listeria monocytogenes, se considera como uno de los principales patógenos causantes de enfermedades severas en el humano, asociándose a la acción de la toxina listeriolisina O (Rosimin *et al.* 2016; Maury *et al.* 2017), es considerada una de las bacterias patógenas que ha causado gran preocupación en la producción de hortalizas como melones, ya que además de asociarse a la superficie de este fruto, se ha relacionado con el equipo y maquinaria utilizada durante su empaquetamiento (Webb *et al.* 2015; Dolan *et al.* 2018). La presencia de *L. monocytogenes* se asocia a la frecuente contaminación de alimentos por *L. innocua*, la cual es considerada como una bacteria no patógena y distribuida ampliamente en el ambiente (Favaro *et al.* 2014), sin embargo, algunas cepas atípicas de *L. innocua* se han caracterizado por presentar factores de virulencia de *L. monocytogenes*, considerándose como patógenas y un vehículo para la transferencia de genes (Kelly *et al.* 2009; Rosimin *et al.* 2016)

La resistencia múltiple a antibióticos en cepas de *L. monocytogenes* se demostró desde el año 1988, así como su gran habilidad de transferencia de genes, tales como los de resistencia a tetraciclina (*tetM*), a través del proceso de conjugación realizado inter e

intraespecies, en donde especies de *Enterococcus* y *Streptococcus*, han sido los principales reservorios, así también ha mostrado habilidad de transferir genes de resistencia (Kelly *et al.* 2009). Se ha reportado resistencia natural a algunos antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas y cefalosporina, específicamente cefotaxima, cefepima, fosfomicina y lincosamidas (de Vasconcelos Byrne *et al.* 2016).

2.4.4. *Enterococcus* spp.

El género *Enterococcus* es considerado en el grupo de los estreptococos fecales del grupo D según la clasificación de Rebeca Lancelfield para estos microorganismos, teniendo como requerimientos principales para su crecimiento, vitaminas del grupo B y aminoácidos. Se encuentran en el tracto intestinal de humanos y animales incluyendo aves e insectos, y es considerado como parte del microbioma normal con niveles aproximados de 10^7 UFC/g de heces fecales. Posee la capacidad de resistir condiciones de refrigeración, congelación, desecación, pH bajo, concentraciones variadas de agua y NaCl, así mismo, se ha reportado su presencia en alimentos como vegetales, suelo y agua, teniendo viabilidad hasta por 4 meses (Maheux *et al.* 2011; Lerma *et al.* 2014; Ray and Bhunia 2014; Public Health Agency of Canadá 2011).

Aun cuando es considerada como bacteria comensal en el humano, recientemente, han aumentado los casos de infecciones por este microorganismo, en donde *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* han sido las especies aisladas en la mayoría de los casos (Kafil *et al.* 2015; Pieniz *et al.* 2015). El cuadro que provocan incluye endocarditis, infecciones y bacteriemias en tracto urinario e intestinal, heridas y catéteres intravasculares (Agudelo y Huycke 2014). Muchas de las cepas presentan resistencia a varios antibióticos y factores o procesos que influyen en su virulencia como agregación (*asaI*), producción de citolisina (*cyl*), hialuronidasa (*hyl*) y gelatinasa (*gelE*) (Arabestani *et al.* 2017) principalmente. Así mismo, se reporta que especies de *Enterococcus* encontradas en alimentos, presentan muchos de los genes mencionados anteriormente (Pieniz *et al.* 2015).

La presencia de especies de *Enterococcus* en la superficie de frutas y vegetales, no ha sido determinada claramente, sin embargo, se ha reportado que este microorganismo se encuentra hasta en un 70% de las muestras de productos frescos como el melón (Johnston y Jaykus 2004), y han presentado resistencia múltiple a antibióticos del grupo de cefalosporinas, lincosaminas y β -lactámicos (Johnston y Jaykus 2004; Said *et al.* 2015).

2.5. Resistoma

Desde el descubrimiento de la penicilina, los antibióticos han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, lo cual ha llevado al desarrollo y adquisición de resistencia por parte de los microorganismos causantes de estas enfermedades (Newell *et al.* 2010; Woon y Fisher 2016). Sin embargo, se estima que la resistencia a antibióticos ha estado presente desde antes del descubrimiento de estos (Gilling y Stokes 2012).

El conjunto de todos los genes asociados o no al fenotipo de resistencia a antibióticos, para el estudio del origen, evolución, mecanismos y emergencia de la resistencia adquirida por antibióticos, se le conoce como resistoma (Perry *et al.* 2014). Dentro del término, se incluyen a bacterias patógenas y no patógenas, las cuales se encontrarían como principales reservorios de genes (Gillings 2014; Perry *et al.* 2014; Bakour *et al.* 2016).

La adquisición de resistencia se da por diversos métodos, entre los cuales se encuentran los cambios genotípicos o fenotípicos y/o por genes o elementos transponibles o móviles, lo cual se ve incrementado al exponerse a concentraciones subletales del compuesto (Händel *et al.* 2016). Aun cuando la adquisición de resistencia permite a las bacterias el crecer en presencia de antibióticos en altas concentraciones, la capacidad de adaptación y la carga metabólica se pueden encontrar disminuidas (Händel *et al.* 2016).

Tan solo en Estados Unidos se asocian alrededor de 23,000 muertes por año a la resistencia bacteriana a antibióticos (Chang *et al.* 2014), lo cual ha llevado a definir a estos microorganismos resistentes dentro del grupo ESKAPE (decir que significa), microorganismos patógenos en los que la resistencia a antibióticos ha aumentado durante

los últimos años. Dentro de este grupo se incluyen cepas de *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, y *Enterobacter*, los cuales causan problemas de salud principalmente asociados a centros hospitalarios (AmábileCuevas 2010). Esta adquisición de resistencia se puede deber en gran medida a la transferencia de estos genes por especies de microorganismos, patógenos o no patógenos, confiriendo “resistencia natural” dentro del ambiente microbiano (Allen 2014).

La resistencia a antibióticos se considera actualmente como una amenaza mundial (Colello *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016), en la cual las bacterias patógenas van aumentando su habilidad para adquirir resistencia, lo que está causando problemas con en el uso de antibióticos como tratamiento de enfermedades (Perry *et al.* 2014). Se ha visto que está alta resistencia también es propiciada por el uso incorrecto de antibióticos en humanos y en el área de agricultura, para cultivos y animales de granja. Esto último es de suma importancia ya que se calcula que el consumo anual de antibióticos con fines para crecimiento acelerado y prevención de enfermedades en ganado es de aproximadamente 13 millones de kilogramos (Chang *et al.* 2014).

2.5.1. Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes es uno de los principales mecanismos descritos para la adquisición de genes de resistencia en bacterias, de la misma o diferente especie, el cual puede suceder por 1) transformación natural (ADN exógeno), 2) transducción (bacteriófagos) o 3) conjugación (Schroeder *et al.* 2017).

2.5.1.1. Transformación

La transformación es un proceso por el cual las bacterias son capaces de tomar ADN exógeno, integrarlo y expresarlo como propio en su genoma. Es un principio descrito desde 1928 por Griffith, en el cual se demostró la capacidad de diversas cepas de *Streptococcus pneumoniae* por intercambiar ADN de forma natural. Este mecanismo es el principal por el cual se lleva a cabo la adquisición de genes de resistencia a antibióticos,

y que quedó demostrado durante los años cincuenta, con la adquisición de genes de resistencia a penicilinas y estreptomicinas (von Wintersdorff *et al.* 2016). Así mismo, se determinaron ciertas condiciones necesarias para la adquisición de ADN exógeno, en donde la bacteria receptora debe de encontrarse en estado competente para la transformación, lo cual puede presentarse de forma natural, o ser inducido por las condiciones del medio o moléculas como autoinductores y que el ADN exógeno se encuentre estabilizado para evitar su degradación (von Wintersdorff *et al.* 2016).

2.5.1.2. Transducción

La transducción es un proceso mediado por bacteriófagos al iniciar un proceso de infección bacteriano, permitiendo la alta diseminación de genes y/o secuencias genéticas a estos microorganismos (von Wintersdorff *et al.* 2016). Entre las secuencias con alta capacidad de transferencia se reportan ADN cromosomal, plasmídico, transposones e islas genómicas o de patogenicidad, en las cuales la movilización y transferencia de genes de resistencia a antibióticos se reporta con alta frecuencia.

La habilidad de los bacteriófagos por sobrevivir en ambientes externos, superficies y/o corrientes de agua, ha permitido descubrir procesos de transducción para múltiples antibióticos como tetraciclina, eritromicina y β -lactámicos, presentes en muestras ambientales de agua y heces provenientes de humanos y animales, indicando a los bacteriófagos como reservorios de genes de resistencia a antibióticos (von Wintersdorff *et al.* 2016).

2.5.1.3. Conjugación

El mecanismo de conjugación se define como la transferencia de ADN mediante un proceso que requiere contacto célula-célula por medio de un pili conjugativo o adhesinas de superficie presentes en las bacterias, así como de una maquinaria especializada de conjugación codificada en genes cromosomales o plasmídicos (von Wintersdorff *et al.* 2016). Este mecanismo provee de cierta protección del medio exterior para los elementos

a transferir, como plásmidos o transposones, así como de vías efectivas para la entrada e integración de estos elementos a la célula receptora (von Wintersdorff *et al.* 2016).

La conjugación de elementos móviles que confieren resistencia a antibióticos ha sido observada en diversos ambientes y superficies como suelo, agua, alimentos y en patógenos asociados a enfermedades nosocomiales, considerando a la conjugación como un mecanismo establecido para la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos como quinolonas, aminoglucosidos, tetraciclinas, sulfonamidas y β -lactámicos (von Wintersdorff *et al.* 2016).

2.5.2. Resistencia a antibióticos en alimentos

El uso de antibióticos en alimentos, contribuyen a incrementar el riesgo de resistencia por microorganismos patógenos y no patógenos (Newell *et al.* 2010). Bacterias comensales como *E. coli* o *Enterococcus* spp. pueden obtener genes por transferencia horizontal, convirtiéndose en un riesgo indirecto para el hospedero (Josephs-Spaulling *et al.* 2016). El riesgo generado por la adquisición de genes de resistencia debe de valorarse en la misma magnitud aun cuando se genere en bacterias no patógenas, las cuales se han considerado con mayor capacidad de diseminación y transferencia de genes a bacterias patógenas (Bengtsson-Palme 2018).

La cadena de producción de alimentos es considerada como una ruta de dispersión de bacterias resistentes y de genes de resistencia, lo cual estimula que bacterias adaptadas al ambiente adquieran fácilmente y compartan diversos genes de resistencia mediante su transferencia horizontal (Bengtsson-Palme 2018).

Las frutas y vegetales que se han encontrado implicados en la diseminación de bacterias resistentes y genes de resistencia presentan características de cultivo asociadas al uso de fertilizantes basados en estiércol de animales tratados con antibióticos (Tien *et al.* 2017; Bengtsson-Palme 2018), sin embargo, se han derivado casos asociados al uso previo de

antibióticos para la prevención de enfermedades de estos alimentos (Bengtsson-Palme 2018).

2.5.3. Uso de antibióticos en agricultura

El uso de antibióticos en agricultura ha llevado a un aumento en la cantidad de microorganismos resistentes, los cuales, por tener contacto directo con el humano, se consideran como principales vehículos de transmisión de los mismos, determinando tres mecanismos por los cuales la resistencia a antibióticos se transfiere a un reservorio humano (Chang *et al.* 2014):

1. Infección de animales por bacterias patógenas resistentes a antibióticos que previamente tuvieron contacto con animales de granja o ingestión de alimentos o agua contaminada.
2. Infección al igual que el mecanismo 1, sin embargo, se encuentran las condiciones para la transmisión entre humanos de las bacterias patógenas resistentes a antibióticos.
3. Transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas para humanos.

2.5.4. Reservorios de genes

Algunos microorganismos comensales establecidos en ambientes naturales son reservorios de genes de resistencia a antibióticos, los cuales pueden ser transferidos a bacterias patógenas presentes en el humano o ambientes que tengan un contacto directo con este hospedero (Berghlund 2015). Se ha descrito que en el área de agricultura la diseminación de genes de resistencia a antibióticos se debe a su presencia en ambientes como suelo, aguas residuales y desechos provenientes de humanos y animales, siendo transferidos principalmente a bacterias patógenas (von Wintersdorff *et al.* 2016).

Especies de bacterias no patógenas como *Kluyvera*, presentes en ambientes naturales, poseen genes de resistencia antibióticos en su genoma, permitiéndoles tener alta capacidad de diseminación, principalmente a bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (von Wintersdorff *et al.* 2016).

Recientemente, se reportó la transferencia del gen *mcr-1*, para resistencia a colistina, a bacterias asociadas al microbioma de humanos, en donde se encontró a los animales de granja como los reservorios principales (von Wintersdorff *et al.* 2016; Ye *et al.* 2016). Así mismo, genes para β -lactamasas, presentes en enterobacterias, son transferidos por especies de *Shewanella*, la cual se encuentra presente en ambientes acuáticos (von Wintersdorff *et al.* 2016).

2.5.5. Grupos de antibióticos de importancia en áreas agrícolas

2.5.5.1. β -lactámicos

El grupo de antibióticos considerados como β -lactámicos, han sido utilizados mundialmente como agentes de primera línea de defensa para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias (Adler *et al.* 2016).

La presencia de genes que confieren resistencia a β -lactámicos se han encontrado en ambientes con temperaturas extremas como en las capas de suelo de permafrost con más de 30,000 años de antigüedad, considerándose como los principales genes en el inicio de la resistencia bacteriana múltiple (Berglund 2015). *E. coli* fue el primer microorganismo para el cual se reportó por primera vez la presencia de enzimas hidrolizantes de β -lactámicos, conocidas como β -lactamasas, de las cuales actualmente se ha identificado más de 1000 diferentes y que confieren resistencia principalmente para penicilinas y cefalosporinas (Adler *et al.* 2016; Van Duijkeren *et al.* 2018), otros mecanismos de resistencia a β -lactámicos incluyen a la reducción en la unión a proteínas de unión a

penicilina (PBPs), así como disminución de la permeabilidad de membrana o el incremento en la síntesis de bombas de eflujo (Van Duijkeren *et al.* 2018).

El surgimiento y uso masivo de nuevas familias de β -lactámicos, así como antibióticos de última generación, determinó la generación de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), las cuales codifican para la resistencia de la mayoría de los β -lactámicos conocidos (Brolund y Sandegren 2015; Adler *et al.* 2016). Estas enzimas son sintetizadas principalmente por bacterias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*.

Una de las principales características que presentan las bacterias productoras de ESBL, es su capacidad para la resistencia a otras familias de antibióticos como fluoroquinolonas y aminoglucósidos, dificultando el tratamiento de los pacientes.

2.5.5.2. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son un grupo de antibióticos conocidos como de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, los cuales se han utilizado desde finales de los años ochenta. Son derivados de la familia de las quinolonas, sin embargo, a diferencia de estos, la adición de un átomo de fluorita clasifica a las fluoroquinolonas con potente acción y amplio espectro (Redgrave *et al.* 2014), la cual se lleva a cabo inhibiendo la replicación bacteriana (Van Duijkeren *et al.* 2018).

La adquisición de resistencia a fluoroquinolonas, se presenta mediante dos mecanismos principales: 1) mutaciones en el gen de las ADN topoisomerasas y 2) reducción en la acumulación del antibiótico intracelular mediante bombas de eflujo, para evitar que el antibiótico llegue al sitio blanco de acción; además se ha reportado cierta capacidad de resistencia mediante la presencia de plásmidos de resistencia a quinolonas (PMQR) (Redgrave *et al.* 2014; Van Duijkeren *et al.* 2018).

En forma principal, las mutaciones responsables de la adquisición de resistencia a fluoroquinolonas se generan en los genes para la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*), así como para la ADN topoisomerasa IV (*parC* y *parE*), sin embargo, la resistencia generada por PMQR provoca la presencia de genes de protección a la ADN girasa (*qnr*), que se encuentran asociados a elementos móviles y grupos de incompatibilidad de plásmidos. (Van Duijkeren *et al.* 2018).

2.5.5.3 Tetraciclinas

Los antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas son utilizados ampliamente en áreas de agricultura y de salud en humanos y animales. Se reportan como antibióticos presentes de manera natural en el ambiente, ya que son secretados por la orina y heces en forma activa hasta en un 70%, lo que lleva a la adquisición de resistencia por bacterias adaptadas a los ambientes naturales (Daghrir y Drogui 2013).

Los mecanismos de resistencia a tetraciclinas se derivan de la presencia de genes de bombas de eflujo, de enzimas de inactivación y de protección del ribosoma (Van Duijkeren *et al.* 2018). La gran diversidad de los genes que codifican para resistencia a tetraciclinas (*tet*) y su eventual capacidad de ser codificados en elementos móviles, han contribuido a su presencia y disseminación en muchas bacterias y ambientes naturales como aguas residuales, en donde se ha reportado la presencia de los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetM*, *tetO*, *tetS* y *tetQ* (Berglund 2015).

La mayoría de los genes *tet*, se encuentran codificados en plásmidos y transposones, los cuales generalmente se relacionan con la presencia de genes que codifican resistencia a otros grupos de antibióticos como macrólidos (Berglund 2015).

2.5.5.4 Macrólidos

Los macrólidos, son un grupo de antibióticos altamente efectivos para el tratamiento de infecciones bacterianas graves, su mecanismo de acción se encuentra enfocado en la

inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión en la subunidad 50S del ribosoma, y como consecuencia la inhibición del crecimiento bacteriano (Kannan *et al.* 2014; Van Duijkeren *et al.* 2018).

La adquisición de resistencia para este grupo de antibióticos se encuentra codificado principalmente en los genes de metilasas de ARNr (*erm*), los cuales se encuentran tanto en el ADN genómico como en plasmídico y confieren resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina (Van Duijkeren *et al.* 2018). Al ser encontrados en aguas residuales y animales, se definen como genes ampliamente distribuidos en la naturaleza (Berglund 2015).

2.5.5.5 Sulfonamidas

Las sulfonamidas, son uno de los grupos de antibióticos de amplio espectro, encontrados en el ambiente de forma persistente, los cuales son eliminados por el humano en un 5090% en forma de metabolitos. Son antibióticos ampliamente utilizados en áreas de agricultura, encontrándose principalmente en suelo, lo que podría llegar a causar la adquisición de resistencia por bacterias adaptadas a estos ambientes (Wang *et al.* 2016).

La resistencia a este grupo de antibióticos se genera mediante la permeabilidad de la membrana, bombas de eflujo y en integrones de clase 1, por los genes *sull* y *sulll*, los cuales se presentan ampliamente distribuidos en ambientes naturales como aguas residuales, suelo y animales de granja (Berglund 2015; Van Duijkeren *et al.* 2018).

2.5.5.6 Colistina

La colistina es un antibiótico perteneciente a la familia de las polimixinas, que fue utilizado por primera vez en el área clínica durante los años cincuenta y que se considera de amplio espectro contra bacterias Gram Negativas, incluyendo a la mayoría de las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Liu *et al.* 2016; Schwarz y Johnson 2016). La colistina, junto con la polimixina B, son los antibióticos utilizados actualmente para tratamiento por infecciones bacterianas en humanos (Liu *et al.* 2016; Van Duijkeren *et al.*

2018) siendo por su alta toxicidad, de uso limitado principalmente en nebulizaciones para pacientes con fibrosis quística e infección pulmonar. La OMS ha aceptado el uso de colistina como de último recurso en infecciones provocadas por bacterias Gram Negativas de resistencia múltiple a la mayoría de los grupos de antibióticos utilizados frecuentemente (Schwarz y Johnson 2016).

La resistencia encontrada por ciertas bacterias a la colistina se debe a la modificación del lípido A de la capa de lipopolisacárido (LPS), dando como resultado, una baja afinidad por las polimixinas (Liu *et al.* 2016). Estos patrones de resistencia se deben principalmente a una codificación cromosómica (Schwarz y Johnson 2016). Sin embargo, Liu *et al.* (2016), reportaron cepas de *E. coli* en donde la resistencia a colistina se encontró por la transferencia del gen *mcr-1*, el cual se codifica en un plásmido encontrado en cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Paterson y Harris 2016). Sin embargo, se han encontrado a ciertos géneros de la familia de las enterobacterias con mecanismos de resistencia a colistina, que es codificado de forma cromosomal, asociados a los genes *pmrAB*, *phoPQ* y el regulador *mgrB*, causando modificación del lípido A (Ye *et al.* 2016).

2.5.6. Factores asociados en la diseminación de genes de resistencia.

2.5.6.1. Integrones:

Los integrones son estructuras genéticas que permiten la adquisición de genes exógenos en la forma de casetes móviles, los cuales se movilizan, integran y expresan dentro del genoma bacteriano. Los integrones se componen de tres elementos genéticos: 1) gen de la integrasa (*intI*), 2) sitio de recombinación (*attI/attC*) y 3) gen promotor (*Pc*), permitiendo su clasificación, a partir de la diversidad en la secuencia del gen de la integrasa (Gillings 2017; de Paula *et al.* 2018; Li *et al.* 2018).

En la actualidad, se han descrito cuatro clases generales de integrones (clase 1 a clase 4), en donde las clases 1 a 3 son conocidas como de resistencia múltiple (Li *et al.* 2018), así

mismo, se han encontrado secuencias de integrones en más de un 15% de los genomas bacterianos secuenciados (Gillings 2017).

Los integrones de clase 1 se consideran como predominantes entre las bacterias, encontrándose en un 22 a 59% en Gram Negativas (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterococcus* y *Klebsiella*) (Li *et al.* 2018), así como en el genoma de bacterias no patógenas (*Betaproteobacteria*) encontradas en ambientes naturales como suelo, agua y biopelículas ambientales (Gillings 2017). Esta clase de integrones, al presentar un sitio de recombinación (*attC*) de rango amplio, tienen la capacidad de adquirir y expresar diversos genes encontrados en el ambiente, sin embargo, son caracterizados por la expresión de genes de resistencia a sulfonamidas (*sulI*) (Gillings 2017; Rizk y El-Mahdy 2017).

Los integrones de clase 2 y 3, aun cuando presentan similitud con la clase 1 en un 40 y 60%, respectivamente, no han sido detectados en un gran número en bacterias Gram Negativas (Rizk y El.Mahdy 2017).

2.5.6.2. Plásmidos:

Los plásmidos son estructuras genéticas extra-cromosomales que permiten la transmisión horizontal de genes mediante el mecanismo de conjugación, uno de los mecanismos más efectivos en la diseminación de genes entre bacterias, permitiendo la evolución y adaptación efectiva en diferentes ambientes (Shintani *et al.* 2015). El mecanismo de transferencia de genes se encuentra relacionado con el proceso de replicación independiente presente en los plásmidos, lo cual ocurre en el sitio conocido como origen de replicación vegetativa (*oriV*) e inicia mediante la actividad de la proteína de inicio de la replicación (*rep*) (Shintani *et al.* 2015).

Uno de los principales problemas asociados a la diseminación de plásmidos es la presencia de genes para ESBL, lo cual causa problemas en el tratamiento de infecciones generadas por enterobacterias (Shintani *et al.* 2015). Así mismo, muchas bacterias Gram Negativas como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* presentan plásmidos de virulencia, los

cuales se asocian con la codificación de ciertos factores de virulencia. Estos plásmidos se encuentran en una familia particular conocida como plásmidos de incompatibilidad (Inc) (Carattoli 2009; Shintani *et al.* 2015).

La incompatibilidad de plásmidos es definida como la inhabilidad de dos plásmidos diferentes de coexistir de forma estable en la misma célula hospedadora al no existir una presión selectiva (Carattoli 2009; Pérez-Oseguera y Cevallos 2013), así mismo, al estar presentes se genera una limitante para obtener nuevos plásmidos y a consecuencia, definir la evolución bacteriana (Pérez-Oseguera y Cevallos 2013). Los plásmidos de incompatibilidad se encuentran dentro de la familia de plásmidos repABC, codificado por el operón *repABC*, generando una asociación entre la replicación y segregación de estos plásmidos (Pérez-Oseguera y Cevallos 2013).

2.6. Viruloma.

La variedad en el contenido genómico bacteriano permite encontrarse en diferentes ambientes interaccionando, ya sea como comensal o patógeno, en donde la expresión, producción, transporte y/o secreción de factores de virulencia de microorganismos patógenos posee mayor impacto en procesos de infección (Nogueira 2013).

Los factores de virulencia se relacionan principalmente a los estadios de infección, inflamación y el desarrollo de enfermedad en el hospedero, adicionalmente, proveen protección a las bacterias para su sobrevivencia a condiciones desfavorables (Chen *et al.* 2016). Principalmente, estos factores de virulencia se relacionan con la regulación del flagelo, curli, fimbrias, adhesinas, producción de biopelículas o factores que generan competencia durante la infección, ya sea por toxinas o antibióticos (Schroeder *et al.* 2017).

Las bacterias patógenas tienen la capacidad de expresar una gran variedad de factores de virulencia, para los cuales se definió el término de viruloma, refiriéndose al conjunto de todos los factores de virulencia que se encuentran en el genoma de las bacterias, encontrándose organizados generalmente en fragmentos del genoma como islas de

patogenicidad, los cuales tienen la característica de ser transferidos horizontalmente y codificar para uno o varios grupos de factores de virulencia (Diard *et al.* 2013; Nogueira 2013; Bakour *et al.* 2016)

La regulación de estos factores por el sistema bacteriano depende en gran parte del balance entre el costo/beneficio que esta expresión generará en la sobrevivencia celular y poblacional (Diard *et al.* 2013).

Los factores de virulencia pueden clasificarse de acuerdo con el modo de acción que poseen dentro del hospedero, como:

1. *Ofensivos*: relacionados con procesos de adherencia (pili, fimbrias y adhesinas), invasión y toxinas (proteolíticas y formadora de poros de membrana)
2. *Defensivos*: relacionados con interacciones con el sistema inmune del hospedero (anti-fagocíticos, proteasas de inmunoglobulinas y variantes antigénicas)
3. *No específicos*: relacionados con la toma de metales como hierro o magnesio, que principalmente tienen la función de tomar nutrientes del hospedero.
4. *Regulatorios*: relacionados a la regulación del sistema inmune en diferentes procesos infecciosos.

2.6.1. Transferencia de genes de virulencia

Los genes de virulencia, al igual que los genes de resistencia a antibióticos, se adquieren mediante mutaciones espontáneas e intercambio de genes a través del mecanismo de transferencia horizontal (Schroeder *et al.* 2017).

La transformación de cepas no patógenas a patógenas mediante este mecanismo es una de las principales preocupaciones, ya que al ser encontradas como reservorios de genes de resistencia a antibióticos, las convierte en agentes potenciales causales de enfermedades y de difícil tratamiento (Chen *et al.* 2015).

2.7. Relación entre resistoma y viruloma

Generalmente, la regulación de genes de virulencia y resistencia se encuentra relacionada, en donde las modificaciones post-traduccionales, respuesta a factores de estrés, formación de biopelícula, comunicación por quorum sensing (QS) y factores ambientales, se encuentran como factores esenciales de esta regulación (Schroeder *et al.* 2017).

Los mecanismos de regulación entre la resistencia a antibióticos y virulencia no se han determinado en su totalidad, causando confusión entre el efecto que esta relación posee en ambos factores (Schroeder *et al.* 2017). Se ha encontrado una relación directa entre la adquisición de resistencia a antibióticos y la producción de factores de virulencia, sin embargo, como caso contrario, la inhibición de factores de virulencia genera un aumento en la resistencia a antibióticos (Rehman *et al.* 2017; Schroeder *et al.* 2017).

Uno de los mecanismos descritos para establecer esta regulación, es la inducción de ciertos factores de virulencia determinados a través de la exposición a ciertos antibióticos, así como inducción de la producción de toxina Shiga en *E. coli*, por fluoroquinolonas, β -lactámicos y sulfonamidas (Bakour *et al.* 2016), demostrando lo generado en la mayoría de las bacterias, en donde se presenta un aumento mutuo entre ambos factores, considerando la posibilidad en la cual su inhibición o reducción, se lleve a cabo de manera conjunta (Schroeder *et al.* 2017).

En vista que se ha relacionado el resistoma y viruloma en bacterias asociadas a productos vegetales, así como la alta incidencia de que se presente transferencia horizontal de genes en el ambiente agrícola, en este trabajo analizamos la incidencia del perfil genético de resistencia a antibióticos y de factores de virulencia asociados al ambiente agrícola del melón.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el uso de antibióticos en áreas de la salud y agrícolas ha aumentado considerablemente, propiciando la adquisición de resistencia por parte de las bacterias adaptadas a estos ambientes, este proceso se puede llevar a cabo a través de elementos móviles (transposones, integrones o plásmidos) y por el uso de mecanismos como la transferencia horizontal de genes. Esta capacidad de presentar genes de resistencia a antibióticos (resistoma) ha sido correlacionada con los mecanismos asociados a la patogenicidad bacteriana, los cuales se relacionan directamente con la adquisición y expresión de diversos factores de virulencia (viruloma).

Se ha reconocido a las bacterias asociadas al ambiente agrícola de frutas y vegetales como principales reservorios de genes y responsables de la diseminación de estos elementos al ambiente agrícola. En particular, en el ambiente de producción de melón, se ha reportado la presencia de bacterias como *E. coli* (manos de pizcadores y agua de riego) y debido a su estructura externa en forma de red, este producto puede permitir la adhesión de diversos microorganismos, tales como *Salmonella enterica* y *L. monocytogenes* principalmente, a su vez, siendo causantes de los diversos brotes asociados al consumo de melón.

De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio se realizó el análisis de la distribución de genes de resistencia a antibióticos (resistoma) y de factores de virulencia (viruloma) asociados al microbioma bacteriano del ambiente agrícola de producción de melón.

4. HIPÓTESIS

El microbioma bacteriano del melón (*C. melo* L.) cultivado en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza, porta genes de resistencia a antibióticos y de virulencia de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis* y *Salmonella* spp.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar el perfil resistómico y virulómico del microbioma bacteriano asociado al melón y su ambiente de producción.

5.2. Objetivos específicos

- Analizar el perfil resistómico del microbioma bacteriano en melón y su ambiente (agua de riego, suelo y manos de pizcadores) en huertas localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza.
- Analizar el perfil virulómico del microbioma bacteriano en melón y su ambiente (agua de riego, suelo y manos de pizcadores) en huertas localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza.
- Establecer la correlación entre cada uno de los genes analizados (resistoma y viruloma) del microbioma bacteriano en melón y su ambiente (agua de riego, suelo y manos de pizcadores) en huertas localizadas en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Recolección de muestras

El área de estudio comprendió de tres huertas de melón en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza, México. La recolección de las muestras se realizó durante los meses de junio y julio de 2017, realizando tres visitas a cada huerta.

Las muestras compuestas recolectadas se trasladaron dentro de hieleras, al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, en donde se les realizaron los procedimientos necesarios para su análisis.

6.1.1. Recolección de muestras: melón

Se colectaron en total 99 muestras compuestas de melón; 36 en la visita 1, 33 en la visita 2 y 30 en la visita 3. Cada muestra compuesta consistió en el lavado de seis melones. Los melones fueron proporcionados por los pizcadores, por lo que el personal de laboratorio no tuvo contacto con ellos.

6.1.1.1 Lavado de melones

Las muestras de melón se realizaron mediante lavado, para lo cual, dos melones fueron colocados en bolsas estériles (Nasco Whirl-Pak de 184 oz, 5441 ml) con 500 ml de agua peptonada estéril al 0.15% (Heredia *et al.* 2016). La superficie de los melones fue tallada a través de la bolsa durante 30 segundos por agitación, 30 segundos de masaje y 30 segundos de agitación extra. Este método se repitió, en tres ocasiones, para tener un enjuague de seis melones.

Posterior al lavado, se retiraron los melones de la bolsa y el agua de enjuague de los seis melones se mezcló obteniendo un volumen final de 1,500 ml (muestra compuesta).

6.1.2. Recolección de muestras: agua

Se colectaron en total 35 muestras de agua; 17 de los sistemas de irrigación y 18 de fuente. Previo a la recolección de las muestras, las bombas y mangueras conectadas se desinfectaron con hipoclorito a 200 ppm y se dejó correr el agua durante 30 s. Las muestras fueron tomadas de dos puntos diferentes de suministro: agua de las mangueras de irrigación y agua de fuente (directamente de la salida de la bomba de extracción). Se tomaron dos muestras para cada uno de los puntos de suministro, las cuales consistieron en 500 ml, en las tres huertas.

Agua de irrigación: se colectaron muestras cercanas al área de la colecta de los melones, las cuales generalmente se encuentran conectadas a una manguera principal y una cinta de goteo, suministrando de agua al cultivo.

Agua de fuente: se recolectaron muestras a partir de la bomba principal que provee de agua a las mangueras de irrigación.

6.1.3. Recolección de muestras: manos

Se colectaron en total 66 muestras de enjuague de manos; 20 en la visita 1, 21 en la visita 2 y 25 en la visita 3. Todas las muestras de enjuagues de manos de pizzadores se tomaron del personal que se encontró trabajando dentro del área de muestreo. Cada muestra se tomó siguiendo el método establecido por Heredia *et al.* (2016) el cual consistió en introducir un mano en una bolsa Nasco Whirl-Pak de 92 oz (2721 ml) conteniendo 750 ml de agua peptonada estéril al 0.15%. Cada mano se agitó durante 30 segundos y se frotó por nuestro personal desde el exterior de la bolsa durante 30 segundos extra. Este procedimiento fue realizado de la misma manera para la otra mano.

6.2. Procesamiento de muestras

Todas las muestras recolectadas se transportaron a nuestro laboratorio y se procesaron durante las primeras 48 h, para el aislamiento genómico del microbioma y la búsqueda de bacterias patógenas e indicadores (*E. coli*, *Salmonella.*, *L. monocytogenes*, *Shigella* y *E. faecalis*) siguiendo el método de filtración por membrana establecido por Heredia *et al.* (2016).

6.3. Determinación del resistoma y del viruloma.

6.3.1. Filtración por membrana

Se utilizó el método de filtración por membrana de diferentes volúmenes según la muestra a analizar (sistema de filtración con vacío Pall Corporation) para la concentración de las muestras. La muestra se hizo pasar a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Millipore) estéril. La membrana resultante, fue utilizada para la extracción del ADN total. Para cada uno de los enjuagues obtenidos se filtraron volúmenes entre 20 a 100 ml.

6.3.2. Extracción de ADN genómico del microbioma del melón

Las membranas de nitrocelulosa se colocaron en un tubo cónico Falcon (Fisher Scientific) de 15 ml y se adicionaron 500 µl de amortiguador GITC (Isotiocianato de Guanidina 5 M, EDTA 100 mM, Sarkosyl 0.5%), para la posterior extracción del material genético siguiendo el protocolo del sistema DNeasy Blood and Tissue (Quiagen) (Marti *et al.* 2013). La concentración de los productos obtenidos se determinó espectrofotométricamente (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

6.3.2.1. Detección de genes por PCR punto final

Los productos obtenidos se sometieron a la detección de diferentes pares de oligonucleótidos codificando para resistencia a antibióticos, elementos móviles, integrasas y factores de virulencia, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Las condiciones de la PCR para cada uno de los genes se determinaron de acuerdo con lo recomendado para cada uno de los oligonucleótidos a analizar, utilizando un termociclador ThermoHybaid (Modelo HBPX110).

Posterior a su amplificación, los genes se visualizaron mediante un gel de agarosa 1% con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (1X), utilizando un fotodocumentador de luz UV (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak). Los genes constitutivos utilizados para la determinación del microbioma y bacterias patógenas se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes constitutivos para la determinación del microbioma bacteriano asociado al ambiente agrícola de melón.

Gen constitutivo	Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Referencia
16S ARNr universal	16S rRNA	CAGGCCTAACACATGCAAGTC GGGCGGWGTGTACAAGGC	Marchesi <i>et al.</i> 1998
<i>Escherichia coli</i>	16S rRNA	CCCCCTGGACGAAGACTGAC ACCGCTGGCAACAAAGGATA	Ferreira <i>et al.</i> 2015
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	TATCGCCACGTTCTGGGCAA TCGCACCGTCAAAGGAACC	Wang <i>et al.</i> 1997
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	Soni y Dubey 2014
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>eda</i>	GGGGACAGTTTTGGATGCTA TCCATATAGGCTTGGGCAAC	Strateva <i>et al.</i> 2015

Tabla 2. Genes de resistencia a antibióticos (A) y factores de virulencia (B) que se utilizaron para la determinación del resistoma y viruloma del microbioma y bacterias patógenas asociadas al melón y su ambiente.

Tabla 2 (A). Genes de resistencia a antibióticos.

Grupo de antibióticos	Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Referencia
β-lactámicos	<i>blaCARB-4</i>	TAATAAGAAAAGCAAGTAGGA AACTATGATTGGGGATTGAG	Marti <i>et al.</i> 2013
	<i>blaOXA-5</i>	AGCCGCATATTTAGTTCTAG ACCTCAGTTCCTTTCTCTAC	
	<i>blaSHV</i>	GGTTATGCGTTATATTCGCC TTAGCTTTGCCAGTGCTC	
	<i>ctxm-1</i>	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	Garrec <i>et al.</i> 2011
	<i>ampC</i>	GGGAATGCTGGATGCACAA CATGACCCAGTTCGCCATATC	Bockelmann <i>et al.</i> 2009
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	GCGGTCTTCTTCATCATGC CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	Marti <i>et al.</i> 2013
	<i>tetB</i>	CATTAATAGGCGCATCGCTG TGAAGGTCATCGATAGCAGG	
Macrólidos	<i>ermA</i>	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	
	<i>ermB</i>	CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAA AGGC GAATCGAGACTTGAGTGTGC	
	<i>ermF</i>	TCGTTTTACGGGTCAGCACTT CAACCAAAGCTGTGTCGTTT	Schmidt <i>et al.</i> 2015
Sulfonamidas	<i>sul1</i>	GTGAACGGTGTTTCGGCATTCT TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	Marti <i>et al.</i> 2013
Fluoroquinolonas	<i>qnrA</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	

CONTINUACIÓN			
	<i>parE</i>	TACCGAGCTGTTCTTGTGG GGCAATGTGCAGACCATCA	Iranzad <i>et al.</i> 2017
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC TATGCACGCGAAAGAACTGGC	Chabou <i>et al.</i> 2016
Glicopéptidos	<i>vanB</i>	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	Talebi <i>et al.</i> 2015
Integrinas	<i>intI</i>	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC	Marti <i>et al.</i> 2013
	<i>intII</i>	TTATTGCTGGGATTAGGC ACGGCTACCCTCTGTTATC	
	<i>intIII</i>	AGTGGGTGGCGAATGAGTG TGTTCTTGTATCGGCAGGTG	
Plásmidos	<i>oriV</i>	CTCCCGTACTAACTGTCACG ATCGACCGAGACAGGCCCTGC	
	<i>oriT</i>	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG	

Tabla 2 (B): Genes de factores de virulencia

Grupo de virulencia	Bacteria	Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Referencia
Toxinas	<i>Escherichia coli</i>	<i>stx1</i>	CAGTTAAGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	Vidal <i>et al.</i> 2005
		<i>stx2</i>	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	
		<i>lt</i>	GTAGGGAAGCGAACAGAG AAGCTCCGTGTGCCTGAA	Wang <i>et al.</i> 1997
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	Soni y Dubey 2014
Adhesión	<i>Escherichia coli</i>	<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	Conte <i>et al.</i> 2014
		<i>bfp</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT GGAATCAGACGCAGACTGGTA	Vidal <i>et al.</i> 2005
		<i>aafII</i>	CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC	
		<i>eae</i>	TCAATGCAGTTCGGTTATCAGTT GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	
		<i>papC</i>	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	Soborg <i>et al.</i> 2013
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>efaA</i>	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA CTACTAACACGTCACGAATG	Dupré <i>et al.</i> 2003
		<i>ccf</i>	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	Abriouel <i>et al.</i> 2008

CONTINUACIÓN				
Adhesión	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>esp</i>	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	Enayati <i>et al.</i> 2015
Invasión	<i>Salmonella enterica</i>	<i>invA</i>	TATCGCCACGTTTCGGGCAA TCGCACCGTCAAAGGAACC	Wang <i>et al.</i> 1997
		<i>spiA</i>	AACAAATGRCCTACRACAGG CSAAACTGCAGGGAGAAAAA	Soborg <i>et al.</i> 2013
	<i>Shigella spp.</i>	<i>ipaH</i>	CTTGACCGCCTTTCCGATAC CAGCCACCCTCTGAGAGTA	Wang <i>et al.</i> 1997

6.4. Análisis estadístico

Se analizó la presencia de genes para resistencia a antibióticos y factores de virulencia. Para determinar la correlación entre cada uno de los genes analizados, se utilizó un análisis de correlación Pearson (X^2) ($P \leq 0.05$). La distribución (%) se obtuvo mediante el conteo total (presencia-ausencia) de los genes analizados para cada una de las muestras. Los análisis y gráficas se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism, versión 7.04 (La Jolla California, USA).

7. RESULTADOS

La evaluación del resistoma y viruloma del microbioma bacteriano se realizó a partir de 200 muestras, 99 provenientes de melón, 66 de manos de pizcadores, 17 de agua de irrigación y 18 de agua de fuente, las cuales fueron obtenidas de tres huertas de melón en la región de Paila, Coahuila de Zaragoza, México. Se analizaron mediante PCR punto final, 20 genes de resistencia a antibióticos (resistoma) y 15 genes que codifican para factores de virulencia (viruloma) de *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroinvasiva, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp, *E. faecalis* y *Shigella* spp.

Los muestreos se realizaron durante el periodo de primavera-verano del año 2017. La primera visita se realizó el 6 de junio, la segunda el 20 de junio y la tercera el 25 de julio. Las descripciones de las huertas visitadas y tipo de muestra tomada se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. Características y tipo de muestra para cada una de las huertas de melón visitadas.

Huerta	Ubicación de la huerta (Coordenadas)	Visita	Número de muestras			
			Muestras compuestas de melón	Manos	Agua de irrigación	Agua de fuente
1	25.6288922,- 101.8247441	1	12	7	1	2
		2	12	6	2	2
		3	12	7	2	2
2	25.7497653, - 102.2532605	1	11	7	2	2
		2	11	7	2	2
		3	11	7	2	2
3	25.7101264,- 102.2884528	1	10	8	2	2
		2	10	8	2	2
		3	10	9	2	2

7.1. Perfil de resistencia a antibióticos asociado al ambiente agrícola de melón.

La determinación del perfil de resistencia a antibióticos arrojó mayor presencia de genes para integrones de clase 1 (*intI*), encontrándolos en 134/200 muestras (67%), los cuales, a su vez, se asociaron con alta presencia de genes para antibióticos del grupo de sulfonamidas (*sulI*), presentándose en 90/200 (45%) del total de muestras (Fig. 1). Las muestras del lavado de manos de los pizcadores fueron los principales reservorios para ambos genes, encontrando el 57/66 (86%) y 47/66 (71%) de los genes *intI* y *sulI* respectivamente (Fig. 3).

Las muestras de agua de irrigación, a diferencia del agua de fuente, mostraron menor frecuencia de genes de resistencia a antibióticos, sin embargo, en ambos tipos de muestras se presentaron con mayor frecuencia los genes *intI* y *sulI*, destacando que en todas las muestras de agua de fuente se encontró al gen *intI* (Fig. 6).

Adicionalmente, se encontró con mayor frecuencia la presencia de genes de resistencia para los antibióticos del grupo de tetraciclinas (*tetA* y *tetB*). Estos estuvieron presentes en 105/200 (53%) de las muestras analizadas (Fig. 1). La familia de β -lactámicos (*blaCARB4*, *blaOXA-5*, *blaSHV*, *ctxm-1* y *ampC*), también se encontró con mucha frecuencia, ya que fueron encontrados en 98/200 (49%) de las muestras analizadas, destacando el gen *blaCARB-4* que fue encontrando con mayor frecuencia (41/200, 21%) (Fig. 1).

La presencia del gen para colistina (*mcrI*), antibiótico de último recurso perteneciente al grupo de polimixinas, se encontró en 25/200 (13%) de muestras analizadas (Fig. 1), y especialmente las muestras que provenían del lavado de manos presentaron mayor frecuencia del gen (15/66, 23%) (Fig. 3). Un dato interesante es que este gen no se encontró en las muestras de agua (Tabla 4).

Tabla 4. Total de muestras positivas (%) para genes asociados a la resistencia a antibióticos para cada una de las muestras analizadas de diferentes puntos en el ambiente agrícola de melón.

Grupo de antibióticos	Genes Analizados	Tipo de muestra (número)				
		No. de positivos (%)				
		Melón (99)	Manos (66)	Sistemas de agua (35)	Agua de irrigación (17)	Agua de fuente (18)
β-lactámicos	<i>blaCARB-4</i>	21 (21)	20 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>blaOXA-5</i>	2 (2)	3 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>blaSHV</i>	8 (8)	15 (23)	3 (9)	1 (6)	2 (11)
	<i>ctxmI</i>	8 (8)	8 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>ampC</i>	10 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	18 (18)	35 (53)	7 (20)	0 (0)	7 (39)
	<i>tetB</i>	18 (18)	24 (36)	3 (9)	1 (6)	2 (11)
Macrólidos	<i>ermA</i>	5 (5)	5 (8)	1 (3)	0 (0)	1 (6)
	<i>ermB</i>	14 (14)	11 (17)	1 (3)	1 (6)	0 (0)
	<i>ermF</i>	6 (6)	4 (6)	2 (6)	0 (0)	2 (11)
Sulfonamidas	<i>sulI</i>	30 (30)	47 (71)	13 (37)	2 (12)	11 (61)
Fluoroquinolonas	<i>qnrA</i>	11 (11)	26 (39)	7 (20)	1 (6)	6 (33)
	<i>parE</i>	54 (54)	53 (80)	19 (54)	6 (35)	13 (72)
Polimixinas	<i>mcrI</i>	10 (10)	15 (23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Glicopéptidos	<i>vanB</i>	5 (5)	4 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Integrones	<i>intI</i>	53 (53)	57 (86)	25 (71)	7 (41)	18 (100)
	<i>intII</i>	4 (4)	28 (42)	2 (6)	0 (0)	2 (11)
	<i>intIII</i>	19 (19)	30 (45)	6 (17)	1 (6)	5 (28)
Plásmidos	<i>oriV</i>	34 (34)	39 (59)	10 (29)	2 (12)	8 (44)
	<i>oriT</i>	4 (4)	20 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

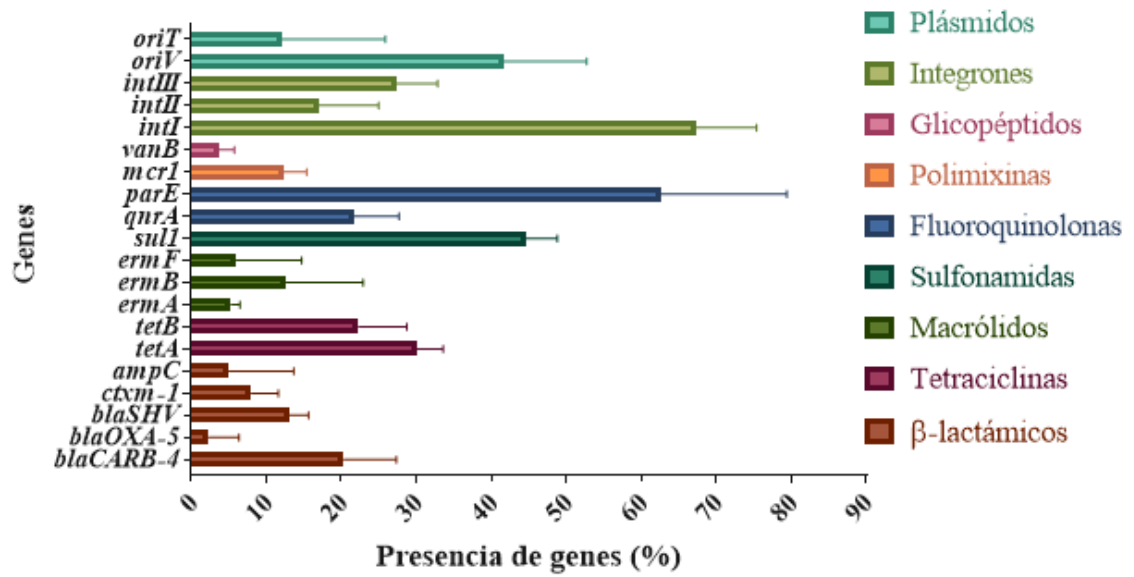


Fig. 1. Distribución de genes asociados a la resistencia a antibióticos en 200 muestras procedentes del ambiente agrícola de melón (melón, manos de pizcadores, agua de irrigación y agua de fuente).

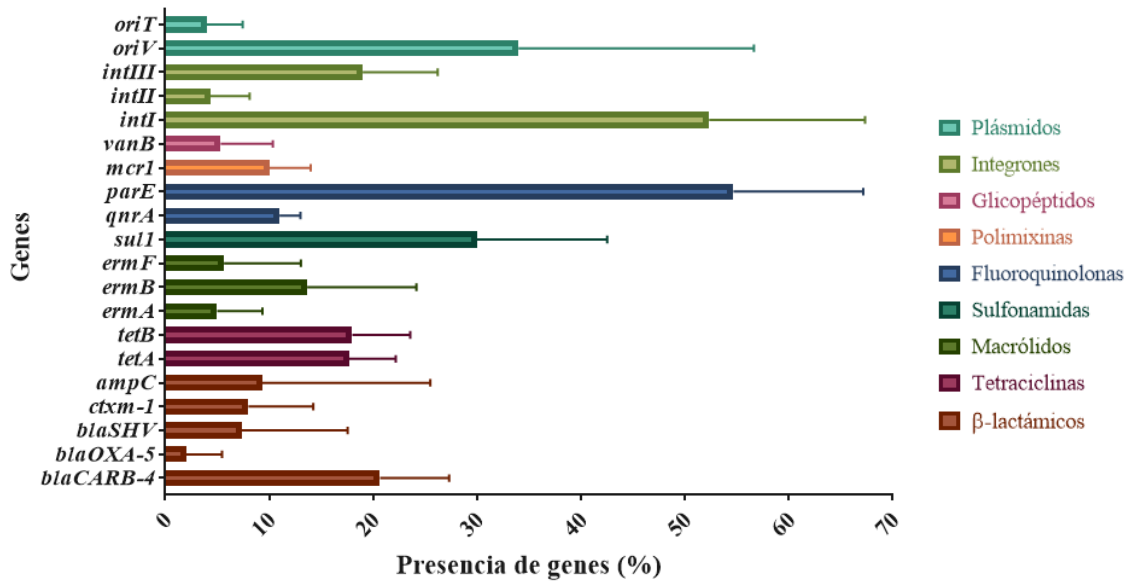


Fig. 2. Distribución de genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de melón.

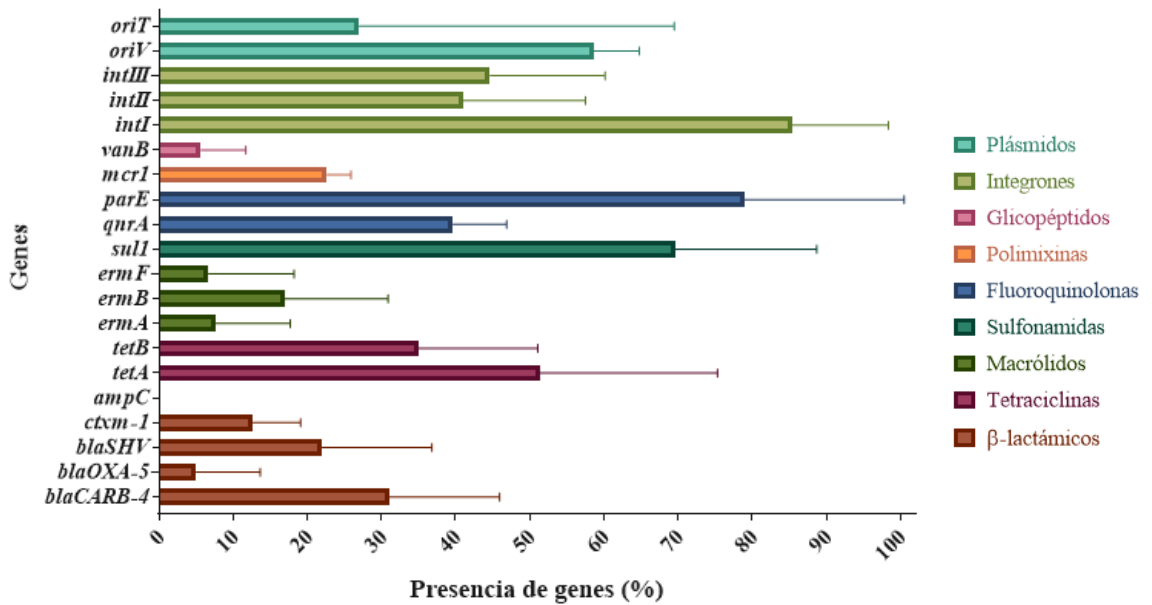


Fig. 3. Distribución de genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de manos de picadores.

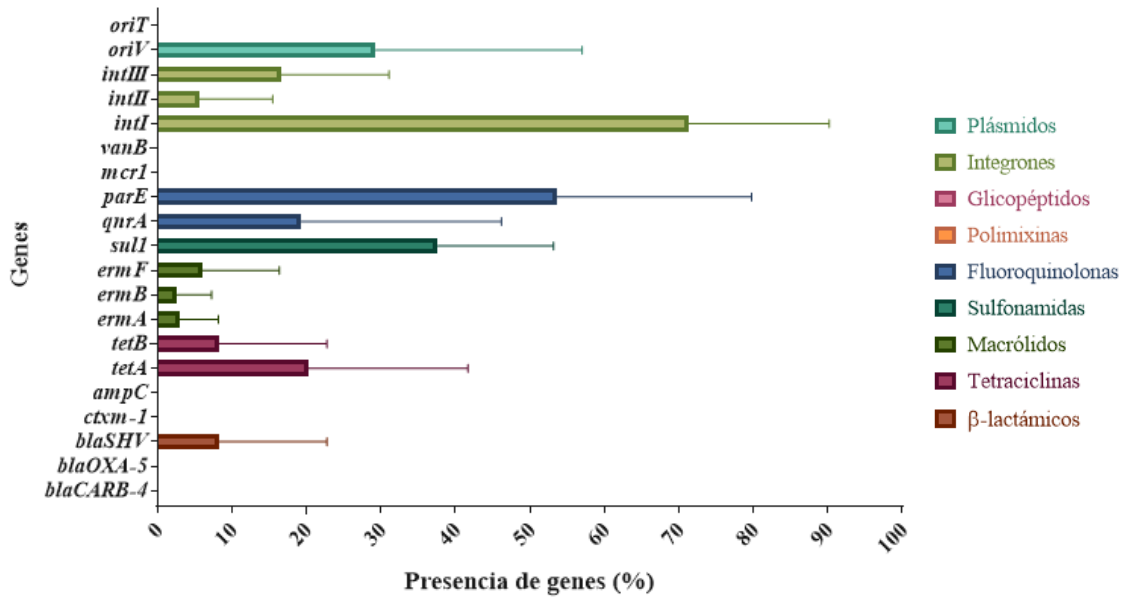


Fig. 4. Distribución de genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de agua (irrigación y fuente).

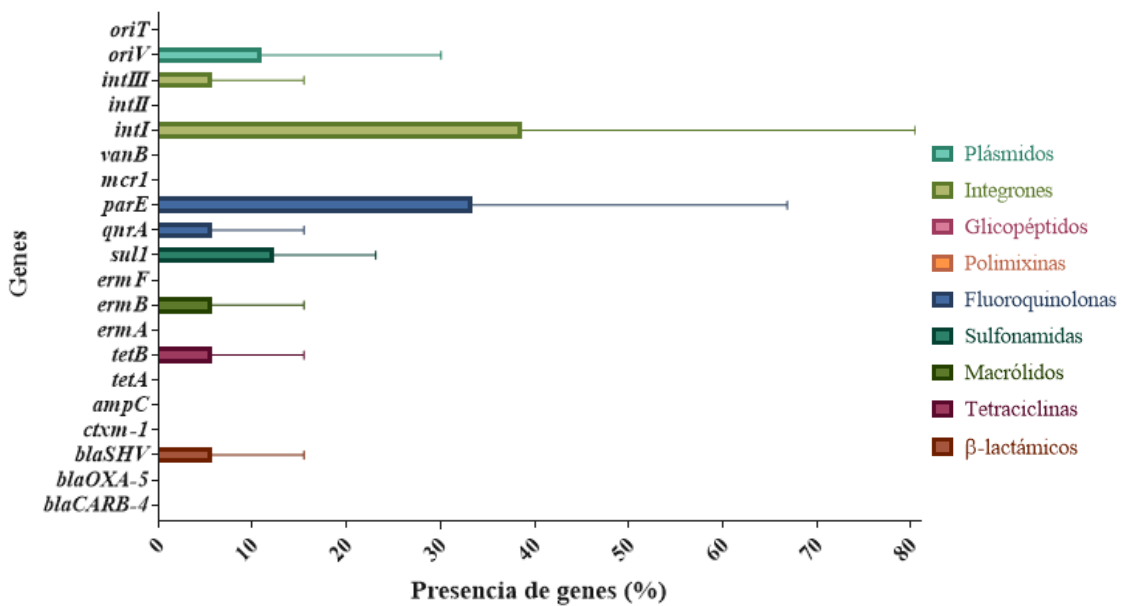


Fig. 5. Distribución de genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de agua de irrigación.

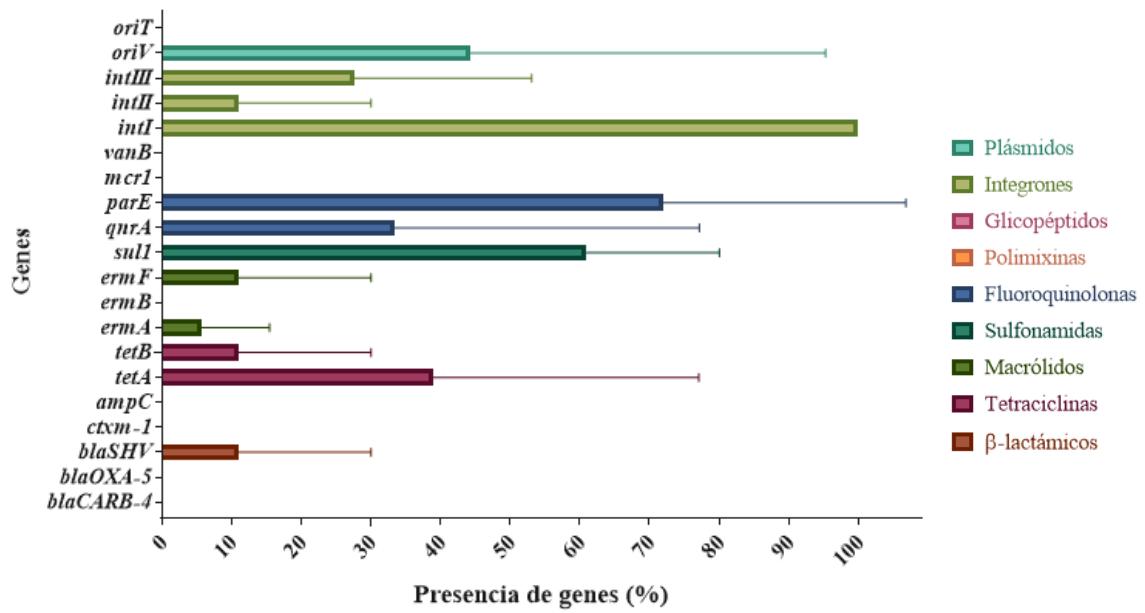


Fig. 6. Distribución de genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de agua de fuente.

7.2. Perfil de virulencia asociado al ambiente agrícola de melón.

El análisis de genes asociados a 15 factores de virulencia de *E. coli*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. faecalis* y *Shigella* spp. se encuentra resumido en la Fig. 7. Se encontró al gen asociado a la proteína de invasión InvA de *Salmonella* spp en mayor número de muestras 86/200 (43%), sin embargo, esta tendencia no se presentó en las muestras de melón y agua de irrigación ya que el gen *ccf*, de *E. faecalis* se observó en mayor proporción de muestras de melón, mientras que en las muestras de agua de irrigación no se detectó ninguno de estos genes (Tabla 5; Fig. 8; Fig 11).

Cuando analizamos genes que codifican para toxinas, se encontraron al menos uno de ellos en 37/200 (19%) de las muestras analizadas, aunque no se encontró en ninguna de las muestras de agua de irrigación (Fig. 7; Fig. 11). El gen que codifica para la toxina Shiga 2 (*stx2*) se encontró en 11/99 (11%) de muestras de melón y el de la toxina Shiga 1 (*stx1*) fue encontrada en 20/66 (30%) de las muestras de enjuagues de manos (30%). Los genes que codifican para la toxina termolábil (*lt*) de *E. coli* enterotoxigénica y para la hemolisina (*hlyA*) de *L. monocytogenes* no se detectaron en ninguna de las 200 muestras analizadas (Tabla 5).

El análisis de los ocho genes analizados asociados a procesos de adhesión (*fimH*, *bfp*, *aafII*, *papC*, *eae*, *efaA*, *ccf* y *esp*) mostró que los genes *fimH* de *E. coli* y *ccf* de *E. faecalis* se detectaron con mayor frecuencia (50/200, 25%) y (51/200, 26%) respectivamente (Fig. 7). Un aspecto interesante fue que el gen *fimH* se encontró en todas las muestras (200) analizadas (Tabla 5). Adicionalmente, ninguna de las muestras analizadas mostró la presencia de los genes *ipaH* de *Shigella* spp, y *efaA* y *esp* de *E. faecalis*.

Tabla 5. Total de muestras positivas (%) para genes asociados a factores de virulencia para cada una de las muestras analizadas de diferentes puntos en el ambiente agrícola de melón.

Grupo de factor de virulencia	Genes	Tipo de muestra				
		No. de positivos (%)				
		Melón (99)	Manos (66)	Sistemas de agua (35)	Agua de irrigación (17)	Agua de fuente (18)
Toxinas	<i>stx1</i>	1 (1)	20 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>stx2</i>	11 (11)	4 (6)	1 (3)	0 (0)	1 (6)
	<i>lt</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>hlyA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Adhesinas	<i>fimH</i>	17 (17)	29 (44)	4 (11)	1 (6)	3 (17)
	<i>bfp</i>	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>aafII</i>	0 (0)	12 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>papC</i>	1 (1)	3 (5)	1 (3)	1 (6)	0 (0)
	<i>eae</i>	3 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>efaA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>ccf</i>	31 (31)	20 (30)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Esp</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Invasión	<i>invA</i>	27 (27)	47 (71)	12 (34)	0 (0)	12 (67)
	<i>spiA</i>	14 (14)	14 (21)	4 (11)	0 (0)	4 (22)
	<i>ipaH</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

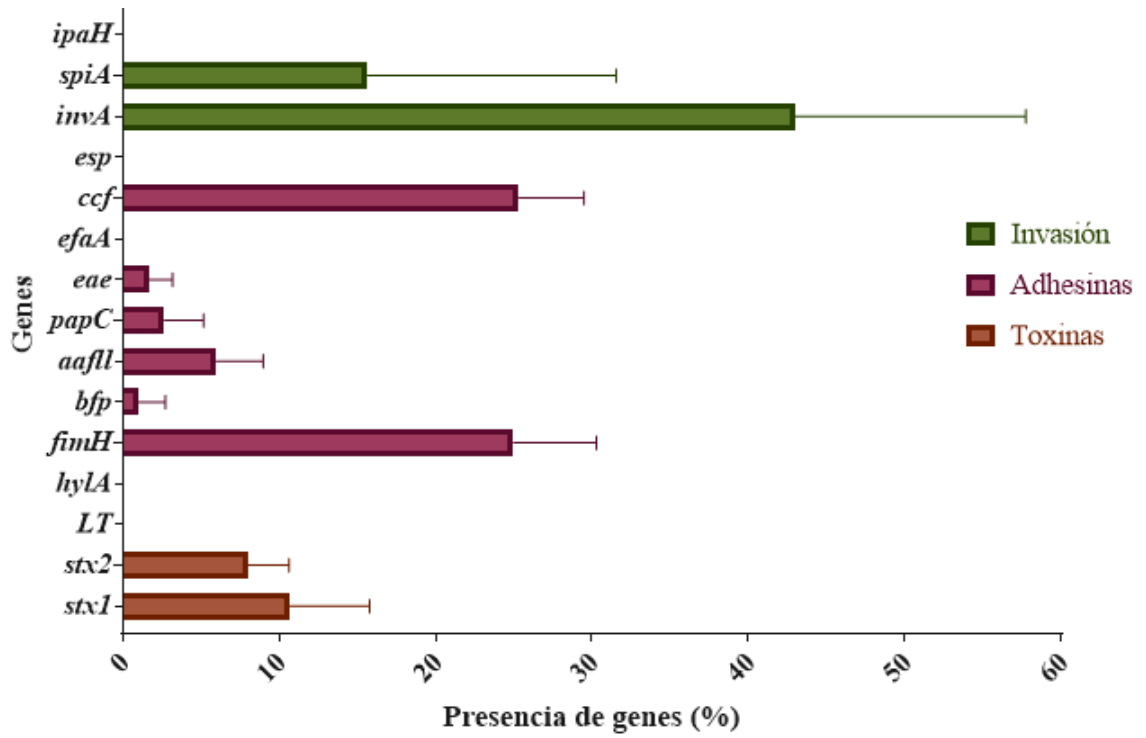


Fig. 7. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en 200 muestras procedentes del ambiente agrícola del melón de (melón, manos de pizzadores, agua de irrigación y agua de fuente).

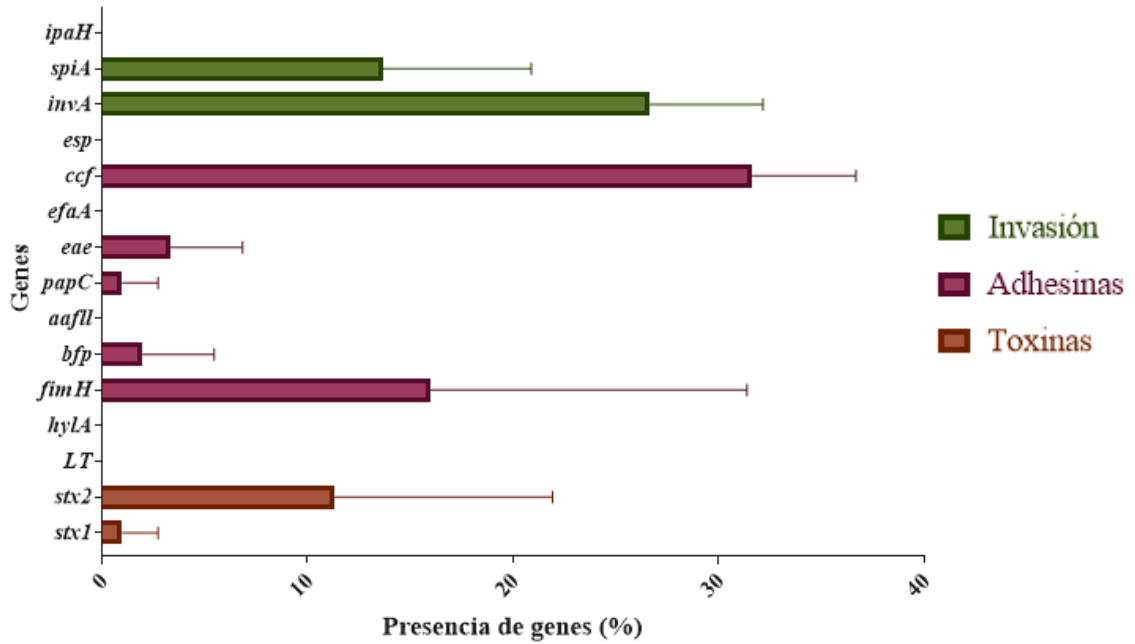


Fig. 8. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de melón.

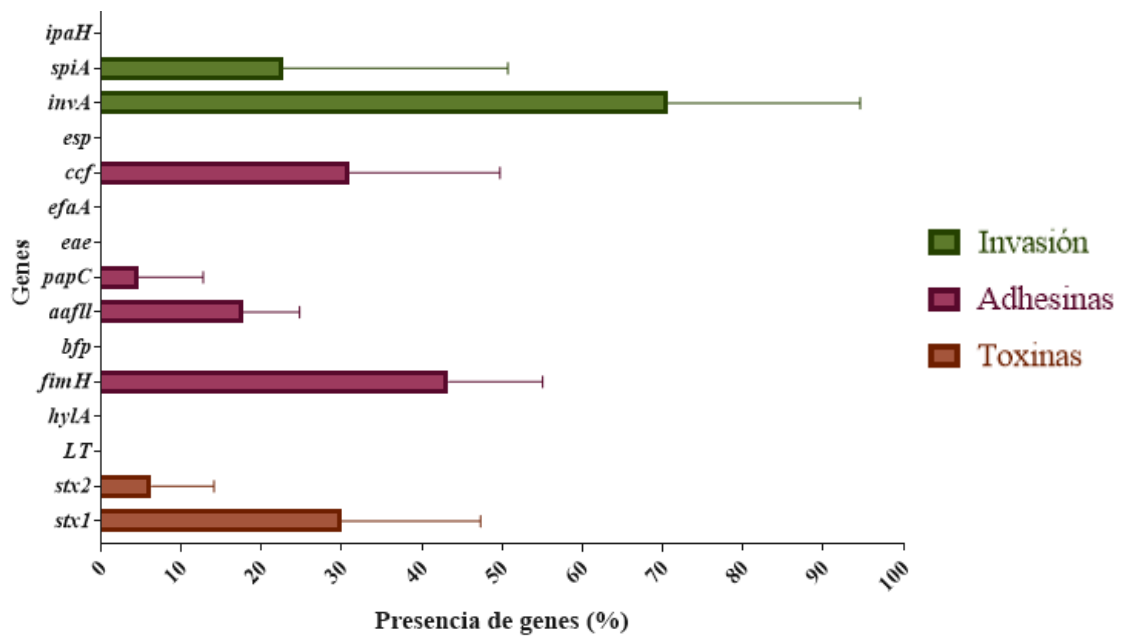


Fig. 9. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de manos de pizzadores.

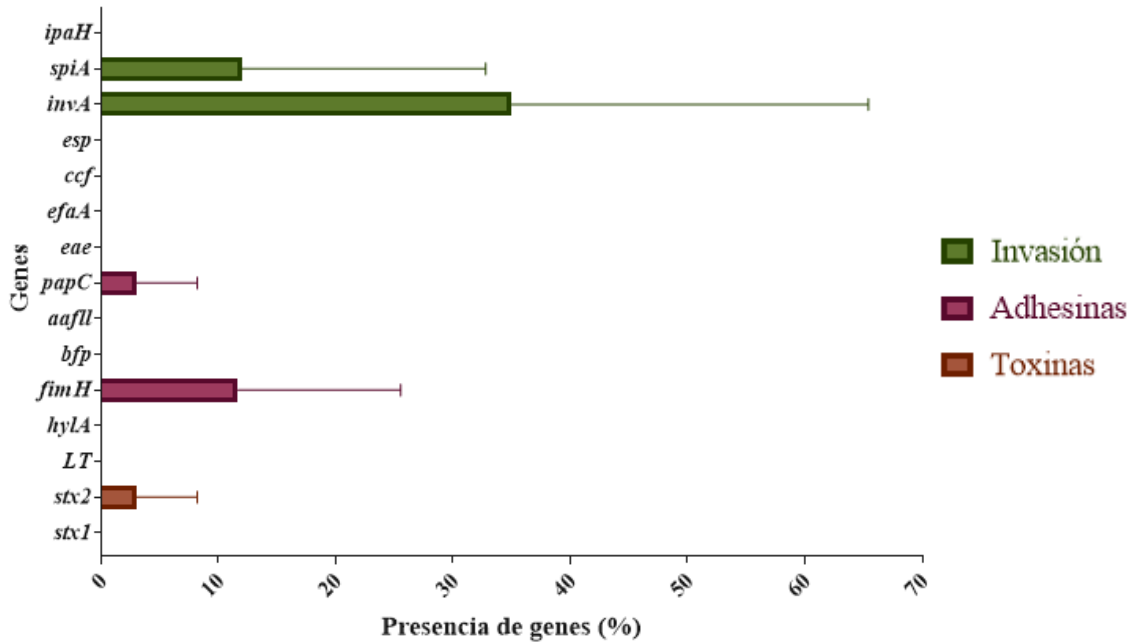


Fig. 10. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua (irrigación y fuente).

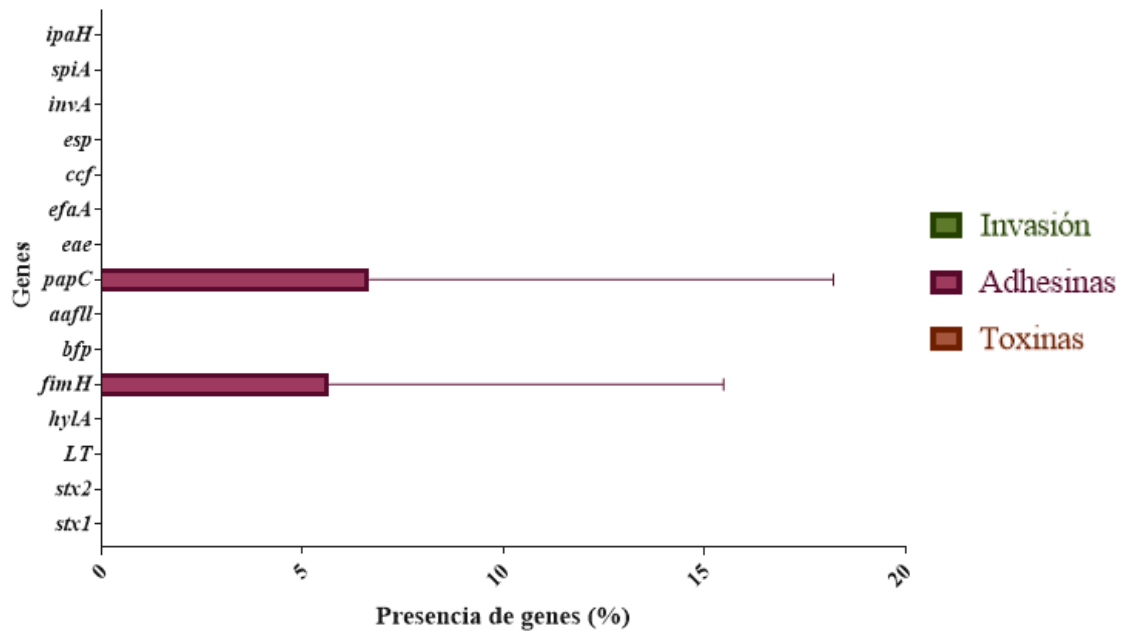


Fig. 11. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua de irrigación.

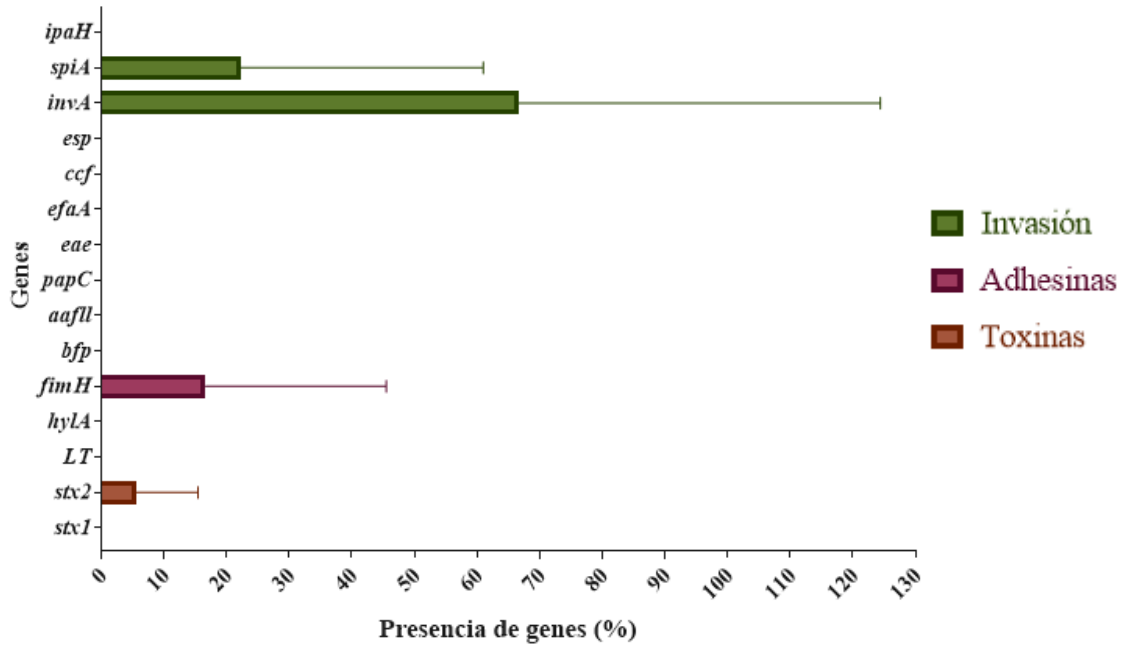


Fig. 12. Distribución de genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua de fuente.

7.3. Correlación de genes analizados en muestras del ambiente agrícola de melón.

Mediante el análisis de correlación de Pearson (r), se permitió conocer la asociación que presentan los genes analizados para cada una de las muestras.

7.3.1. Genes de resistencia a antibióticos.

Del total de las muestras analizadas, se observó correlación positiva (1.000 y 0.999) ($P \leq 0.05$) entre los genes del grupo β -lactámicos (*blaCARB-4* y *blaSHV*) con los genes *oriV* y *vanB* (Tabla 6). Al analizar las muestras independientes, solo en las muestras de melón se observó correlación positiva ($P \leq 0.05$) entre los genes *blaOXA-5* y *ampC* del grupo de los β -lactámicos (Tabla 7).

También se encontró correlación entre el gen del integron de clase 1 (*int1*) y el de resistencia a sulfonamidas (*sul1*) en las muestras de melón ($P \leq 0.05$) (Tabla 7).

Tabla 6. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a la resistencia a antibióticos en el total de muestras del ambiente agrícola de melón.

Genes	<i>blaC-ARB-4</i>	<i>blaOXA-5</i>	<i>blaSHV</i>	<i>ctxM-1</i>	<i>ampC</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>sulI</i>	<i>qnrA</i>	<i>pacE</i>	<i>mcrI</i>	<i>vanB</i>	<i>intI</i>	<i>intII</i>	<i>intIII</i>	<i>oriV</i>	<i>oriT</i>
<i>blaC-ARB-4</i>		0.082	-0.969	0.987	0.082	-0.750	0.074	0.904	0.953	0.196	0.160	-0.646	-0.928	-0.590	-0.980	0.552	-0.569	-0.612	1.000*	-0.871
<i>blaOXA-5</i>	0.082		-0.327	0.240	1.000*	-0.721	-0.988	0.500	-0.225	0.993	-0.971	-0.814	-0.447	0.756	-0.277	-0.786	-0.866	-0.839	0.104	-0.561
<i>blaSHV</i>	-0.969	-0.327		-0.996	-0.327	0.891	0.176	-0.982	-0.847	-0.434	0.091	0.815	0.992	0.371	0.999*	-0.327	0.756	0.789	-0.974	0.966
<i>ctxM-1</i>	0.987	0.240	-0.996		0.240	-0.846	-0.086	0.961	0.892	0.350	0.000	-0.759	-0.976	-0.454	0.999	0.412	-0.693	-0.750	0.990	-0.938
<i>ampC</i>	0.082	1.000	-0.327	0.240		-0.721	-0.988	0.500	-0.225	0.993	-0.971	-0.814	-0.447	0.756	-0.277	-0.786	-0.866	-0.839	0.104	-0.561
<i>tetA</i>	-0.750	-0.721	0.891	-0.846	-0.721		0.604	-0.961	-0.513	-0.795	0.533	0.989	0.943*	-0.091	0.866	0.137	0.971	0.982	-0.765	0.978*
<i>tetB</i>	0.074	-0.988	0.176	-0.086	0.604	0.604		-0.359	0.374	-0.963	0.996	0.714	0.303	-0.849	0.125	0.872	0.778	0.744	0.052	0.425
<i>ermA</i>	0.904	0.500	-0.982	0.961	0.500	-0.961	-0.359		0.731	0.596	-0.277	-0.910	-0.998	-0.189	-0.971	0.143	-0.866	-0.891	0.913	-0.997
<i>ermB</i>	0.953	-0.225	-0.847	0.892	-0.225	-0.513	0.374	0.731		-0.112	0.452	-0.383	-0.771	-0.808	-0.874	0.780	-0.292	-0.342	0.946	-0.680
<i>ermF</i>	0.196	0.993	-0.434	0.350	0.993	-0.795	-0.963	0.596	-0.112		-0.937	-0.875	-0.547	0.676	-0.386	-0.710	-0.918	-0.896	0.218	-0.632
<i>sulI</i>	0.160	-0.971	0.091	0.000	-0.971	0.533	0.996	-0.277	0.452	-0.937		0.651	0.220	-0.891	0.038	0.911	0.721	0.683	0.138	0.346
<i>qnrA</i>	-0.646	-0.814	0.815	-0.759	-0.814	0.989	0.714	-0.910	-0.383	-0.875	0.651		0.884	-0.235	0.784	0.281	0.995	0.999*	-0.662	0.937
<i>pacE</i>	-0.928	-0.447	0.992	-0.976	-0.447	0.943	0.303	-0.998	-0.771	-0.547	0.220	0.884		0.247	0.983	-0.202	0.835	0.862	-0.936	0.991
<i>mcrI</i>	-0.590	0.756	0.371	-0.454	0.756	-0.091	-0.849	-0.189	-0.808	0.676	-0.891	-0.235	0.247		0.419	-0.999	-0.327	-0.277	-0.372	0.118
<i>vanB</i>	-0.980	-0.277	0.999	-0.999	-0.277	0.866	0.125	-0.971	-0.874	-0.386	0.038	0.784	0.983	0.419	-0.376	0.721	0.756	0.756	-0.984	0.951
<i>intI</i>	0.552	-0.786	-0.327	0.412	-0.786	0.137	0.872	0.143	0.780	-0.710	0.911	0.281	-0.202	-0.999	-0.376		0.371	0.322	0.533	-0.071
<i>intII</i>	-0.569	-0.866	0.756	-0.693	-0.866	0.971	0.778	-0.866	-0.292	-0.918	0.721	0.995	0.835	-0.327	0.721	0.371		0.999*	-0.588	0.900
<i>intIII</i>	-0.612	-0.839	0.789	-0.750	-0.839	0.982	0.744	-0.891	-0.342	-0.896	0.683	0.999	0.862	-0.277	0.756	0.322	0.999		-0.629	0.921
<i>oriV</i>	1.000	0.104	-0.974	0.990	0.104	-0.765	0.052	0.913	0.946	0.218	0.138	-0.662	-0.936	-0.572	-0.984	0.533	-0.588	-0.629		-0.882
<i>oriT</i>	-0.871	-0.561	0.966	-0.938	-0.561	0.978	0.425	-0.997	-0.680	-0.652	0.346	0.937	0.991	0.118	0.951	-0.071	0.900	0.921	-0.882	

*Correlación significativa ($P \leq 0.05$)

Tabla 7. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de melón. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>ampC</i>	<i>tetB</i>	<i>ermF</i>	<i>sulI</i>	<i>intI</i>	<i>intIII</i>	<i>oriT</i>
blaCARB-4	0.564	0.728	0.720	0.863	0.847	0.666	0.997*
blaOXA-5	1.000*	-0.156	0.979	0.069	0.038	-0.240	0.500
blaSHV	0.989	-0.009	0.998*	0.215	0.185	-0.095	0.622
ctxm-1	-0.277	0.992	-0.076	0.939	0.949	0.999*	0.693
<i>ampC</i>		-0.156	0.979	0.069	0.038	-0.240	0.500
<i>tetA</i>	0.832	0.418	0.928	0.611	0.586	0.338	0.896
<i>tetB</i>	-0.156		0.049	0.975	0.981	0.996	0.778
<i>ermA</i>	0.596	-0.886	0.420	-0.760	-0.779	-0.923	-0.397
<i>ermB</i>	0.027	0.983	0.230	0.999*	1.000*	0.964	0.879
<i>ermF</i>	0.979	0.049		0.271	0.241	-0.038	0.666
<i>sulI</i>	0.069	0.975	0.271		1.000*	0.952	0.899
<i>qnrA</i>	0.000	-0.988	-0.203	-0.998	-0.999	-0.971	-0.866
<i>parE</i>	-0.877	-0.338	-0.957	-0.539	-0.513	-0.255	-0.854
<i>mcr1</i>	0.866	-0.629	0.746	-0.439	-0.466	-0.693	0.000
<i>vanB</i>	0.115	-0.999	-0.090	-0.983	-0.988	-0.992	-0.803
<i>intI</i>	0.038	0.981	0.241	1.000		0.961	0.885
<i>intII</i>	-0.991	0.024	-0.997	-0.200	-0.170	0.110	-0.610
<i>intIII</i>	-0.240	0.996	-0.038	0.952	0.961		0.721
<i>oriV</i>	-0.115	0.999*	0.090	0.983	0.988	0.992	0.803
<i>oriT</i>	0.500	0.778	0.666	0.899	0.885	0.721	

*Correlación significativa ($P \leq 0.05$)

Tabla 8. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de manos de pizzadores. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>ermF</i>	<i>vanB</i>	<i>intIII</i>	<i>oriT</i>
blaCARB-4	-0.348	-0.261	-0.944	-0.592
blaOXA-5	1.000*	-0.814	0.019	-0.550
blaSHV	-0.995	0.869	0.083	0.632
ctxm-1	0.988	-0.895	-0.137	-0.673
<i>ampC</i>				
<i>tetA</i>	-0.950	0.955	0.295	0.783
<i>tetB</i>	-0.807	1.000*	0.575	0.937
<i>ermA</i>	-0.663	0.105	-0.761	-0.261
<i>ermB</i>	-0.436	-0.167	-0.908	-0.511
<i>ermF</i>		-0.814	0.019	-0.550
<i>sulI</i>	-0.895	0.988	0.430	0.865
<i>qnrA</i>	-0.559	-0.027	-0.840	-0.385
<i>parE</i>	0.040	0.547	1.000*	0.812
<i>mcr1</i>	0.629	-0.060	0.789	0.304
<i>vanB</i>	-0.814		0.565	0.933
<i>intI</i>	-0.686	0.981	0.715	0.985
<i>intII</i>	-0.577	0.944	0.806	0.999*
<i>intIII</i>	0.019	0.565		0.825
<i>oriV</i>	0.189	0.416	0.985	0.716
<i>oriT</i>	-0.550	0.933	0.825	

*Correlación significativa ($P \leq 0.05$)

Tabla 9. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de agua (irrigación y fuente). Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>intII</i>
<i>blaCARB-4</i>				
<i>blaOXA-5</i>				
<i>blaSHV</i>	-0.500	-0.500	-0.500	-0.500
<i>ctxm-1</i>				
<i>ampC</i>				
<i>tetA</i>	1.000*	-0.500	1.000*	-0.500
<i>tetB</i>	-0.500	1.000*	-0.500	1.000*
<i>ermA</i>		-0.500	1.000*	-0.500

***Correlación significativa ($P \leq 0.05$)**

Tabla 10. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de agua de irrigación. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>ermB</i>	<i>qnrA</i>	<i>intIII</i>	<i>oriV</i>
<i>blaSHV</i>	-0.500	1.000*	1.000*	-0.500
<i>tetB</i>	1.000*	-0.500	-0.500	1.000*
<i>ermB</i>		-0.500	-0.500	1.000*
<i>sulI</i>	-0.990	0.375	0.375	-0.990
<i>qnrA</i>	-0.500		1.000*	-0.500
<i>parE</i>	-0.009	0.870	0.870	-0.009
<i>intI</i>	0.919	-0.117	-0.117	0.919
<i>intIII</i>	-0.500	1.000		-0.500
<i>oriV</i>	1.000	-0.500	-0.500	

***Correlación significativa ($P \leq 0.05$)**

Tabla 11. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a la resistencia a antibióticos en muestras de agua de fuente. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>ermA</i>	<i>ermF</i>	<i>sulI</i>	<i>intII</i>
<i>tetA</i>	1.000*	1.000*	1.000*	-0.500
<i>tetB</i>	-0.500	-0.500	-0.500	1.000*
<i>ermA</i>		1.000*	1.000*	-0.500
<i>ermB</i>				
<i>ermF</i>	1.000		1.000*	-0.500
<i>sulI</i>	1.000	1.000		-0.500
<i>qnrA</i>	-0.658	-0.658	-0.658	-0.323
<i>parE</i>	0.274	0.274	0.274	-0.970
<i>intII</i>	-0.500	-0.500	-0.500	
<i>intIII</i>	-0.942	-0.942	-0.942	0.761
<i>oriV</i>	0.946	0.946	0.946	-0.193

***Correlación significativa ($P \leq 0.05$)**

7.3.2. Genes de virulencia.

Cuando se analizaron las 200 muestras de diferentes orígenes ninguno de los genes asociados a factores de virulencia presentó correlación positiva (Tabla 12); sin embargo, cuando se analizaron las muestras por separado según su origen, se encontró correlación positiva ($P \leq 0.05$) entre los genes de la *Stx1* con *bfp* en las muestras de melón (Tabla 13) y con el gen *invA* encontrado en las muestras de enjuagues de manos (Tabla 14).

Cuando analizamos las muestras de agua (irrigación y fuente), se encontró correlación positiva ($P \leq 0.05$) entre los genes *stx2* y *fimH* con *invA*, *spiA* y *papC*, y entre *papC* con *spiA* (Tabla 15). Al analizar las muestras de agua por separado dependiente de su origen (irrigación o fuente), solo hubo correlación entre los genes *stx2* con *fimH* y *spiA* y entre *fimH* con *spiA* en las muestras de agua de fuente (Tabla 16). En tanto que no encontramos ninguna correlación entre genes de las muestras de agua de irrigación.

Tabla 12. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia en el total de muestras del ambiente agrícola de melón.

Genes	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>fimH</i>	<i>bfp</i>	<i>LT</i>	<i>papC</i>	<i>aagfL</i>	<i>invA</i>	<i>spiA</i>	<i>hylA</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>	<i>ccf</i>	<i>ipaH</i>
<i>stx1</i>		-0.884	0.106	0.037			-0.942	0.292	0.946	0.256				-0.999	
<i>stx2</i>	-0.884		0.371	-0.500			0.676	0.189	-0.988	-0.678				0.908	
<i>eae</i>	0.106	0.371		-0.990			-0.434	0.982	-0.222	-0.934				-0.052	
<i>fimH</i>	0.037	-0.500	-0.990				0.300	-0.945	0.359	0.976				-0.091	
<i>bfp</i>															
<i>LT</i>															
<i>papC</i>	-0.942	0.676	-0.434	0.300				-0.596	-0.782	0.083				0.923	
<i>aagfL</i>	0.292	0.189	0.982	-0.945			-0.596		-0.034	-0.850				-0.240	
<i>invA</i>	0.946	-0.988	-0.222	0.359			-0.782	-0.034		0.556				-0.962	
<i>spiA</i>	0.256	-0.678	-0.934	0.976			0.083	-0.850	0.556					-0.307	
<i>hylA</i>															
<i>efaA</i>															
<i>esp</i>															
<i>ccf</i>	-0.999	0.908	-0.052	-0.091			0.923	-0.240	-0.962	-0.307					
<i>ipaH</i>															

*Correlación significativa ($P \leq 0.05$)

Tabla 13. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia en muestras de melón. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>bfp</i>	<i>spiA</i>
<i>stx1</i>	1.000*	-0.559
<i>stx2</i>	0.790	-0.950
<i>eae</i>	-0.082	-0.781
<i>fimH</i>	-0.225	0.934
<i>bfp</i>		-0.559
<i>papC</i>	-0.500	0.998*
<i>invA</i>	-0.419	0.987
<i>spiA</i>	-0.559	
<i>ccf</i>	-0.803	-0.046

***Correlación significativa ($P \leq 0.05$)**

Tabla 14. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia en muestras de manos de pizzadores. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>invA</i>
<i>stx1</i>	1.000*
<i>stx2</i>	0.721
<i>fimH</i>	-0.656
<i>papC</i>	-1.000
<i>aafl</i>	-0.183
<i>invA</i>	
<i>spiA</i>	0.563
<i>ccf</i>	-0.966

***Correlación significativa ($P \leq 0.05$)**

Tabla 15. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua (irrigación y fuente). Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>spiA</i>
<i>stx2</i>	1.000*	1.000*	1.000*
<i>fimH</i>		1.000*	1.000*
<i>papC</i>	1.000		1.000*
<i>invA</i>	0.569	0.569	0.569
<i>spiA</i>	1.000	1.000	

***Correlación significativa ($P \leq 0.05$)**

Tabla 16. Correlación de Pearson (r) para los genes asociados a factores de virulencia en muestras de agua de fuente. Los valores positivos indican correlación, mientras más cercano está el valor a 1, la correlación es mayor.

Genes	<i>fimH</i>	<i>spiA</i>
<i>stx1</i>		
<i>stx2</i>	1.000*	1.000*
<i>eae</i>		
<i>fimH</i>		1.000*
<i>invA</i>	0.500	0.500
<i>spiA</i>	1.000	

***Correlación significativa ($P \leq 0.05$)**

8. DISCUSIÓN

El microbioma de frutas y vegetales presenta una composición variada de comunidades bacterianas pertenecientes a los filum *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, las cuales son muy importantes para definir la presencia de bacterias patógenas. De igual manera, las prácticas agrícolas también influyen de manera directa en la composición de estas comunidades (Berg *et al.* 2014).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) estima que cada año se producen alrededor de 9.4 millones de casos de ETAs causadas por los principales patógenos conocidos, en donde se ha estimado que el 46% de estas se deriva por el consumo de frutas y vegetales contaminados (Nyarko *et al.* 2018). En particular, durante el periodo de 1973 al 2011, algunos productos frescos como el melón fueron implicados en 34 brotes presentando a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* como los patógenos más frecuentes (Nyarko *et al.* 2018). De acuerdo con nuestros resultados, las muestras analizadas presentaron mayor frecuencia de genes asociados a *Salmonella*, representando un aspecto de interés y preocupación por las diversas enfermedades que en su consumo podría causar.

En el cultivo de frutas y vegetales la abundancia y diseminación de genes se puede intensificar por algunos factores tales como el uso de fertilizantes y agua residual durante la irrigación (Oluyeye *et al.* 2015), además de la falta de higiene del personal que coleta los vegetales (Lavilla *et al.* 2008). Los resultados en este trabajo demostraron la presencia de 19 genes de resistencia a antibióticos y 8 para factores de virulencia en enjuagues de manos de pizcadores, lo que concuerda con los resultados previos, e indicando que los manipuladores podrían propiciar un proceso de diseminación de genes y bacterias presentes en sus manos.

Estudios realizados en vegetales cultivados en suelos sin el uso de fertilizantes a base de composta, han reportado una amplia variedad de genes de resistencia a antibióticos (*oriV*, *sull1*, *ermB*, *tetB*, *blaOXA-5*) presentes en productos como tomate, chile, pepino,

zanahoria, lechuga y rábano (Martí *et al.* 2013). Coincidiendo con nuestros resultados, en donde observamos alta frecuencia de los genes *oriV*, *sulI* y *ermB* en todas las muestras analizadas.

La presencia de genes de resistencia a colistina se ha reportado en muestras clínicas o provenientes de animales de granja principalmente, no obstante, recientemente se ha reportado su presencia en productos cárnicos (Chen *et al.* 2017), sistemas de agua (Zurfeh *et al.* 2016; Chen *et al.* 2017; Jørgensen *et al.* 2017) y vegetales frescos (Zurfeh *et al.* 2016), considerando al gen *mcr-1* como un elemento móvil de alto potencial que puede ser distribuido en el ambiente (Chen *et al.* 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la presencia del gen de resistencia a colistina se presentó en 25/200 (13%) de muestras, que correspondieron a 10/99 (10%) de melón y 15/66 (23%) de enjuague de manos de pizcadores.

Una de las principales vías asociadas a la adquisición y diseminación de genes de resistencia a antibióticos es mediante la presencia de integrones, en donde, los pertenecientes a la clase 1, por encontrarse en elementos móviles, presentan gran potencial para su diseminación en el ambiente generada mediante transferencia horizontal de genes (Domingues *et al.* 2012). La alta correlación del integron de clase 1 (*int1*) con el gen de resistencia a sulfonamidas (*sulI*) se ha reportado en muestras del microbioma de vegetales y suelo de cultivo (Rahube *et al.* 2016), lo cual concuerda con nuestros resultados, en donde se presentó correlación ($P \leq 0.05$) para ambos genes en muestras en melón, que presentó una frecuencia de 53% para el gen *int1* y 30% para *sulI*.

La alta incidencia de genes de resistencia a tetraciclinas (*tet*) en sistemas de agua se ha correlacionado con la presencia de genes de resistencia a sulfonamidas (*sulI*) (Gao *et al.* 2012), lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo entre el gen *tetA* con *sulI* en las muestras provenientes de los sistemas de agua de fuente.

El uso extensivo de antibióticos en áreas de salud, veterinaria y agrícola ha promovido la introducción, diseminación y acumulación de antibióticos y genes de resistencia a en la población bacteriana presente en estos ambientes (Jia *et al.* 2017). Así mismo, la presión selectiva generada por el uso de antibióticos ha permitido que las bacterias evolucionen y presenten mayor capacidad para adquirir genes de resistencia. En la actualidad, una de las principales preocupaciones asociadas con la adquisición de resistencia a antibióticos, es el fenómeno conocido como “superbacterias”, en donde se presenta la adquisición de factores de virulencia que podrían generar situaciones de alerta o brotes epidémicos de gran magnitud (Founou *et al.* 2016).

Sin embargo, la expresión de los factores de virulencia dependerá de diversos factores, tales como los ambientales que se presenten; considerando lo anterior, se conoce que algunos de los llamados “factores de virulencia” no confieren virulencia a la bacteria portadora, no obstante, pueden ser transferidos a otras especies u organismos en donde si lleven a cabo esa función mediante el proceso de transferencia horizontal de genes. En nuestro trabajo encontramos alta frecuencia (68.8%) de genes de virulencia que se pueden encontrar en poblaciones de bacterias patógenas y no patógenas (Bakour *et al.* 2016). Sin embargo, otros estudios han presentado evidencia de la relación benéfica que las bacterias obtienen por la adquisición de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, (Beceiro *et al.* 2013; Schaufler *et al.* 2016; Schroeder *et al.* 2017), por lo que en muchas ocasiones se asocia la resistencia a antibióticos con procesos infecciosos o relacionados con la virulencia (Beceiro *et al.* 2013).

Los productos vegetales se han visto involucrados a brotes epidémicos, por lo que, es de gran importancia analizar el perfil de virulencia asociado a estos productos. A partir de nuestros resultados, las muestras provenientes del melón presentaron los genes *stx1*, *stx2* y *eae* (10.5, 8.0 y 1.5%, respectivamente), asociados a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), sin embargo, el factor de adhesión, *eae*, no se encontró presente en ninguna de las otras muestras del ambiente agrícola analizadas. Similar a nuestros resultados, se reportó un estudio en donde 13 aislamientos provenientes de vegetales identificados como *E. coli*

productora de toxina Shiga (STEC) no contenían el factor de adhesión, íntima (*eae*), aun cuando es considerado como un factor común para este tipo de bacterias; aunque algunas cepas de STEC o enterohemorrágicas (EHEC) en donde no está presente este factor han causado enfermedades severas, incluyendo el síndrome urémico hemolítico (HUS) (Feng y Reddy 2013).

Dentro de los factores de virulencia encontrados con mayor abundancia en las muestras analizadas, se encontró al gen *ccf* (feromonas de *E. faecalis*) en el 31% y 30% de las muestras en melón y enjuague de manos respectivamente. Diversos estudios demuestran la alta frecuencia de *E. faecalis* en ambientes agrícolas, los cuales a su vez presentan factores de virulencia como el gen *ccf* en alrededor del 56%, el cual se asocia a procesos de patogenicidad y colonización del huésped (Lanthier *et al.* 2010). A pesar de que la virulencia asociada a *E. faecalis* se ha reportado con mayor impacto en el área clínica, las cepas asociadas de alimentos han mostrado presentar estos factores de virulencia y ser causantes de enfermedades (Chajęcka-Wierzchowska *et al.* 2017).

El uso de técnicas basadas en métodos moleculares como PCR y PCR cuantitativa han permitido investigar ampliamente la distribución de genes en una variedad de ambientes, sin embargo, estos análisis se limitan al estudio de solo las secuencias blanco conocidas de genes (Jia *et al.* 2017) y a la sensibilidad que estas técnicas presentan, ya que en muchas ocasiones los genes presentes se encuentran en concentraciones menores al límite de detección (Lanza *et al.* 2018).

El proceso de extracción de ADN nos permitió asociar el análisis de genes al microbioma bacteriano de las diferentes muestras, sin embargo, dado que no realizamos el aislamiento bacteriano, es difícil conocer el origen de los 20 genes de resistencia y 12 genes de virulencia encontrados en las muestras analizadas. No obstante, se determinó que las muestras de melón y manos presentaron mayor cantidad de genes de resistencia y virulencia, lo cual deberá de generar alerta por aumentar las prácticas de higiene y saneamiento entre los manipuladores para evitar la diseminación y transmisión de estas bacterias al ambiente.

9. CONCLUSIONES

- 1.- Se demostró la presencia de genes asociados a la resistencia a antibióticos y factores virulencia en muestras de la superficie de melón, enjuagues de manos, agua de irrigación y agua de fuente.
- 2.- Las muestras de melón y enjuague de manos presentaron mayor distribución de los genes asociados a resistencia a fluoroquinolonas (*parE*) e integrones de clase 1 (*int1*), este último también correlacionado con el gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*), mientras que los genes de virulencia con mayor frecuencia en estas muestras pertenecieron a *Salmonella* (*invA*), *E. coli* (*fimH*) y *E. faecalis* (*ccf*).
- 3.- Se demostró la presencia de del gen *mcr-1* para resistencia a colistina y para las toxinas Shiga características *E. coli* enterohemorrágica en 10% de las muestras compuestas de melón y 23% de las muestras de manos de pizcadores.
- 4.- Las muestras de agua (irrigación y fuente) mostraron menor frecuencia de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, sin embargo, el agua de fuente presentó mayor frecuencia de genes asociados a la resistencia a tetraciclinas (*tetA*, *tetB*), del gen *int1* y *parE*, además del gen *invA* y *fimH* en el perfil de virulencia.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H., Omar, B. N., Molinos, C. A., López, L. R., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Cañamero, M. M., and Galvez, A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*. 123:38-49.
- Adler, A., Katz, E. D., and Marchaim, D. 2016. The continuing plague of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae infections. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30:347-375.
- Agudelo, H. N. I., and Huycke, M. M. 2014. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190429/>
- Al-Kharousi, S. Z., Guizani, N., Al-Sadi, M. A., Al-Bulushi, M. I., and Shaharoon, B. 2016. Hiding in fresh fruits and vegetables: opportunistic pathogens may cross geographical barriers. *International Journal of Microbiology*. 16:1-15.
- Allen, J. K., Walecka-Zacharska, E., Chen, C. J., Katarzyna, P. K., Devlieghere, F., Meervenue, V. E., Osek, J., Wiczorek, K., and Bania, J. 2016. *Listeria monocytogenes* – an examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiology*. 54:178-189.
- Allen, K. H. 2014. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Current Opinion in Microbiology*. 19:25-29.
- Amábile-cuevas, F. C. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *Journal of Infectious Developing Countries*. 4(3):126-131.
- Arabestani, R. M., Nasaj, M., and Mousavi, M. S. 2017. Correlation between infective factors and antibiotic resistance in *Enterococci* clinical isolates in west of Iran. *Croatian Medical Journal*. 53:56-63.

- Bakour, S., Sankar, A. S., Rathored, J., Biagini, P., Raoult, D., and Fournier, P. E. 2016. Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics. *Future Microbiology*. 1-13.
- Balkhair, S. K. 2016. Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23:S83-S92.
- Beceiro, A., Tomás, M., and Bou, G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(2):185-230.
- Bengtsson-Palme, J. 2018. Antibiotic resistance in the food supply chain: where can sequencing and metagenomics aid risk assessment?. *Current Opinion in Food Science*. 14:66-71.
- Berg, G., Erlacher, A., Smalla, K., and Krause, R. 2014. Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our “gut feeling”?. *Microbial Biotechnology*. 7(6):487-495.
- Berglund, B. 2015. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection Ecology & Epidemiology*. 5:1-10.
- Böckelmann, U., Dörries, H.H., Ayuso-Gabella, N., de Marçay, S. M., Tandoi, V., Levantesi, C., Masciopinto, C., Van Houtte, E., Szewzyk, U., Wintgens, T., and Grohmann, E. 2009. Quantitative PCR monitoring of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in three European artificial groundwater recharge system. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(1):154-163.
- Bowen, A., Fry, A., Richards, G., and Beuchat, L. 2006. Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiology and Infections*. 134:675-685.
- Brolund, A., and Sandegren, L. 2015. Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infectious Diseases*. 48(1):18-25.
- Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(6):2227-2238.
- Carvalho, F., Sousa, S., and Cabanes, D. 2014. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. Cellular and Infection Microbiology. 4:22.
- Chabou, S., Leangapichart, T., Okdah, L., Page, L. S., Hadjadj, L., and Rolain, M. J. 2016. Real-time quantitative PCR assay with Taqman probe for rapid detection of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance. New Technologies for Infectious and Tropical Diseases. 13:71-74.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadenowska, A., and Laniewska-Trokenheim, L. 2017. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. LWT – Food Science and Technology. 75:670-676.
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., and Hanage, P. W. 2014. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?. Evolutionary Applications. 8:240-245.
- Chen, J., Ram, G., Penadés, R. J., Brown, S., and Novick, P. R. 2015. Pathogenicity island-directed transfer of unlinked chromosomal virulence genes. Cell Press. 57:138-149.
- Chen, K., Chan, W. E., Xie, M., Ye, L., Dong, N., and Chen S. 2017. Widespread distribution of *mcr-1*-bearing bacteria in the ecosystem, 2015 to 2016. Euro Surveillance. 122(39):11.
- Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., and Zhu, G. Y. 2016. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. Environment International. 92:1-10.
- Colello, R., Etcheverría, I. A., Di Conza, A. J., Gutkind, O. G., and Padola, L. N. 2015. Antibiotic resistance and integrons in shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Brazilian Journal of Microbiology. 46:1-5.
- Conte, P. M., Longhi, C., Marazzato, M., Conte, L. A., Aleandri, M., Lepanto, S. M., Zagaglia, C., Nicoletti, M., Alo, M., Totino, V., Palamara, T. A., and Schippa, S. 2014. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. Biomed Central. 7:74-78.

Croxen, A. M., Law, J. R., Scholz, R., Keeney, M. K., Wlodarska, M., and Finlay, B. B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(4):822-880.

Daghrir, R., and Drogui, P. 2013. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemical Letters*. 11:209-227.

De Paula, L. C. A., Medeiros, D. J., de Azevedo, C. A., de Assis Chagas, M. J., da Silva, L. V., and Diniz, G. C. 2018. Antibiotic resistance genetic markers and integrons in white soft cheese: aspects of clinical resistome and potentiality of horizontal gene transfer. *Genes*. 9(106):11.

De Vasconcelos Byrne, V., Hofer, E., Vallim, C. D., and de Castro Almeida, C. R. 2016. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47:438-443.

Delannoy, S., Beutin, L., Burgos, Y., and Fach, P. 2012. Specific detection of enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 strains by use of the CRISPR Locus as a target for a diagnostic real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(11):3485-3492.

Di Giannatale, E., Di Serafino, G., Zilli, K., Alessiani, A., Sacchini, L., Garofolo, G., Aprea, G., and Marotta, F. 2014. Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy. *Sensors*. 14:3308-3322.

Diard, M., García, V., Maier, L., Remus-Emsermann, P. N. M., Regoes, R. R. Ackermann, M., and Hardt, D. W. 2013. Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature*. 494: 353-358.

Dolan, L. H., Bastarrachea, J. L., and Tikekar, V. R. 2018. Inactivation of *Listeria innocua* by a combined treatment of low-frequency ultrasound and zinc oxide. *Food Science and Technology*. 88:146-151.

Domingues, S., Harms, K., Fricke, F. W., Johnsen, J. P., da Silva, J. G., and Nielsen, M. K. 2012. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathogens*. 8(8):15.

Dupré, I., Zanetti, S., Schito, M. A., Fadda, G., and Sechi, A. L. 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology*.

52:491-498.

Enayati, M., Sadeghi, J., Nahael, R. M., Aghazadeh, M., Pourshafie, R. M., and Talebi, M. 2015. Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. *Letters in Applied Microbiology*. 61:339-345.

Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., and Fontana, C. 2014. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etecept. *Journal of Medical Microbiology*. 1-5.

Feng, H. C. P., and Reddy, S. 2013. Prevalence of Shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(22):6917-6923.

Feng, P., Weagant, D. S., and Jinneman, K. 2016. BAM: diarrheagenic *Escherichia coli*. *Bacteriological analytical manual*. Chapter 4A. Food and Drugs Administration (FDA). Diponible en: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070080.htm#fn21> Revisado: 3/03/17.

Feng, P., Weagant, D. S., Grant, A. M., and Burkhardt, W. 2002. BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Disponible en: [http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948 .htm](http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm). Revisado: 08/02/17.

Ferreira, A. R. M., Silva, S. T., Stella, E. A., Conceição, R. F., dos Reis, F. E., and Moreira, N. C. 2015. Detection of virulence factors and antimicrobial resistance patterns in shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 35(9):775-780.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. Microbiological hazards and melons: codex committee on food hygiene working group on the development of an annex on methods for the code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables

(CAC/RCP 53-2003). Disponible en:
ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jemra/Microbiological_hazards_and_melons_Nov08.pdf.

Revisado: 27/01/17.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO). 2008. Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables.

Disponible en:

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jemra/FFV_2007_Final.pdf Revisado: 18/02/17.

Food and Drugs Administration (FDA). 2015. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce: Chapter IV. Outbreaks associated with fresh and fresh-cut produce. incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. Disponible en:

<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091265.htm> Revisado: 26/02/17.

Founou, L. L., Founou, C. R., and Essack, Y. S. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*. 7:19.

Fu, Y., Deering, J. A., Bhunia, K. A., and Yao, Y. 2017. Pathogen biofilm formation on cantaloupe surface and its impact on the antibacterial effect of lauroyl arginate ethyl. *Food Microbiology*. 64:139-144.

Fu, Y., Deering, J. A., Bhunia, K. A., and Yao, Y. 2017. Pathogen biofilm formation on cantaloupe surface and its impact on the antibacterial effect of lauroyl arginate ethyl. *Food Microbiology*. 64:139-144.

Gao, P., Munir, M., and Xagorarakis, I. 2012. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*. 421:173-183.

Garrec, H., Drieux-Rouzet, L., Golmard, L.J., Jarlier, V., and Robert, J. 2011. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β lactamase production by *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(3):1048-1057.

- Gautam, D., Dobhal, S., Payton, E. M., Fletcher, J., and Ma, M. L. 2014. Surface survival and internalization of *Salmonella* through natural cracks on developing cantaloupe fruits, alone or in the presence of the melon wilt pathogen *Erwinia tracheiphila*. PLoS ONE. 9(8): e105248.
- Gillings, M. R., and Stokes, H. W. 2012. Are humans increasing bacterial evolvability? Trends in Ecology and Evolution. 27:346-352.
- Gillings, M. R., Gaze, H. W., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, M. J., and Zhu, Y. G. 2014. Using the class 1 integron-integrase genes as a proxy for anthropogenic pollution. The Journal of the International Society of Microbial Ecology. 9:12691279.
- Gillings, R. M. 2017. Class 1 integrons as invasive species. Current Opinion in Microbiology. 38:10-15.
- Gomes, T. A. T., Elias, P. W., Scaletsky, A. C. I., Guth, C. E. B., Rodrigues, F. J., Piazza, F. M. R., Ferreira, S. C. L., and Martínez, B. M. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Microbiology. 47S:3-30.
- Gómez-Govea, M., Solís-Soto, L., Heredia, N., García, S., Moreno, G., Tovar, O., and Isunza, G. 2012. Analysis of microbial contamination levels of fruits and vegetables at retail in Monterrey, Mexico. Journal of Food, Agriculture & Environment. 10(1):152-156.
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M., and Drosinos, H. E. 2015. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. Food Microbiology. 55:7-15.
- Händel, N., Hoeksema, M. Mata, F. M., Brul, S., and ter Kulle, H. B. 2016. Effects of stress, reactive oxygen species, and the SOS response on de novo acquisition of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Antimicrobials Agents and Chemotherapy. 60(3):1319-1327.
- Heredia, N., Caballero, C., Cárdenas, C., Molina, K., García, R., Solís, L., Burrowes, V., Bartz, E. F., de Aceituno A. F., Jaykus, L. A., García, S., and Leon, J. 2016. Microbial indicator profiling of fresh produce and environmental samples from farms and packing facilities in northern Mexico. Journal of Food Protection. 79(7):1197-1209.

- Iranzad, M., and Hakemi-Vala, M. 2017. The role of *parC*, *parE*, and *qnrB* genes in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 5(3):7.
- Jia, S., Zhang, X. X., Miao, Y. Zhao, Y. Ye, L., Li, B., and Zhang, T. 2017. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water. *Water Research*. 124:259-268.
- Johnston, M. L., and Jaykus, L. A. 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(5):3133-3137.
- Jørgensen, B. S., Søråas, A., Arnesen, S. L., Leegaard, T., Sundsfjord, A., and Jenum, A. P. 2017. First environmental sample containing plasmid-mediated colistin-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* detected in Norway. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 125:822-825.
- Josephs-Spaulding, J., Beeler, E., and Singh, O.V. 2016. Human microbiome versus food-borne pathogens: friend or foe. *Applied and Environmental Microbiology*. 100(11):4845-4863.
- Kafil, S. H., Mobarez, M. A., Moghadam, F. M., Hashemi, S. Z., and Yousefi, M. 2015. Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Microbial Pathogenesis*. 92:30-35.
- Kannan, K., Kanabar, P., Schryer, D., Florin, T., Oh, E., Bahroos, N., Tenson, T., Weissman, S. J., and Mankin, S. A. 2014. The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(45):15968-15963.
- Kaper, B. J., Nataro, P. J., and Mobley, T. L. H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2:123-140.
- Kelly, G. B., Vespermann, A., and Bolton, J. D. 2009. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*. 47:969-977.
- Labbé, G. R., and García, S. 2001. Guide to foodborne pathogens. John Wiley & Sons, Inc. Pp. 143,144.

Lanthier, M., Scoott, A., Zhang, Y., Cloutier, M., Durie, D., Henderson, C. V., Wilker, G., Lapen, R.D., and Topp, E. 2010. Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada. *Journal of Applied Microbiology*. 110:407-421.

Lanza, F. V., Baquero, F., Martínez, L. J., Ramos-Ruíz, R., González-Zorn, B., Andremont, A., Sánchez-Valenzuela, A., Ehrlich, D., Kennedy, S., Ruppé, E., van Schaik, W., Willems, J. R., de la Cruz, F., and Coque, M. T. 2018. In-depth resistome analysis by targeted metagenomics. *Microbiome*. 6:11.

Lavilla, S., González-López, J. J., Miró, E., Domínguez, A., Llagostera, M., Bartolomé, M. R., Mirelis, B., Navarro, F., and Prats, G. 2008. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61:1244-1251.

Leonard, R. S., Mammel, K. M., Lacher, W. D., and Elkins, A. C. 2016. Strainlevel discrimination of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in spinach using metagenomic sequencing. *PLoS ONE*. 11(12):e0167870.

Lerma, L. L., Benomar, N., Valenzuela, S. A., Muñoz, C. C. M., Gálvez, A., and Abriouel, H. 2014. Role of the EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiology*. 44:249-257.

Li, Y., Yang, L., Fu, J., Fu, J., Yan, M., Chen, D., and Zhang, L. 2018. Genotyping and high flux sequencing of the bacterial pathogenic elements – integrons. *Microbial Pathogenesis*. 116:22-25.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, R. T., Yi, X. L., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, F. L., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Shou, H., Liang, Z., Liu, H. J., and Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human being in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infection*. 16:161168.

Maheux, A. F., Bissonnette, L., Boissinot, M., Bernier, T. L. J., Huppé, V., Bérubé, È., Boudreau, K. D., Picard, J. F., Huletsky, A., and Bergeron, G, M. 2011. Method for rapid

and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Research*. 45:2342-2354

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., Dymock, D., and Wade, W. D. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. 64(2):795-799.

Marine, C. S., Pagadala, S., Wang, F., Pahl, M. D., Melendez, V. M., Kline, L. W., Oni, A. R., Walsh, S. C., Everts, L. K., Buchanan, L. R., and Micallef, A. S. 2015. Growing season, but non farming system, a food safety risk determinant for leafy greens in the mid-Atlantic region. *Applied and Environmental Microbiology*. 1-53.

Marti, R., Scott, A., Tien, C. Y., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., and Topp, E. 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(18):5701-5709.

Maury, M. M., Chenal-Francisque, V., Bracq-Dieye, H., Han, L., Leclecq, A., Vales, G., Moura, A., Gouin, E., Scotti, M., Disson, O., Vázquez-Boland, A. J., and Lecuit, M. 2017. Spontaneous loss of virulence in natural populations of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 85(11):13.

Monaghan, M. J., and Hutchison, L. M. 2016. Ineffective hand washing and the contamination of carrots after using a field latrine. *Letters in Applied Microbiology*. 62:299-303.

Newell, G. D., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegen, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F. 2010. Food-borne disease – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. 139:53-S15.

Nogueira, T. 2013. Novel genomic approaches to social interactions within human bacterial communities. *Sociedade Portuguesa de Microbiologia*. 2:12.

Nyarko, E., Kniel, E. K., Zhou, B., Millner, D., P., Luo, Y., Handy, T. E., East, C., and Sharma, M. 2018. *Listeria monocytogenes* persistence and transfer to cantaloupes in the packing environment is affected by surface type and cleanliness.

Food Control. 177-185.

Nyenje, E. M., and Ndip, N. R. 2013. The challenges of foodborne pathogens and antimicrobial chemotherapy: a global perspective. African Journal of Microbiology Research. 7(14):1158-1172.

Oluyeye, J. O., Oluwaniyi, T. T., and Ijasa, O. C. 2015. Composition of antibiotic resistant bacteria from irrigated vegetable farmland. Journal of Microbiology Research. 5(5):161-168.

Paterson, L. D., and Harris, A. N. P. 2015. Colistin resistance: a major breach in our last line of defense. The Lancet Infection. 16:132-133.

Pérez-Oseguera, Á., and Cevallos, A. M. 2013. RepA and RepB exert plasmid incompatibility repressing the transcription of the *repABC* operon. Plasmid. 70:362-376.

Perry, A. J., Westman, L. E., and Wright, D. G. 2014. The antibiotic resistome: what's new?. Current Opinion in Microbiology. 21:45-50.

Pieniz, S., de Moura, M. T., Cassenego, V. P. A., Andreazza, R., Frazzon, G. P. A., and de Oliveira Camargo, A. F. 2015. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. Food Control. 51:49-54.

Public Health Agency of Canada. 2011. *Enterococcus faecalis*. Pathogen safety data sheet – infectious substances. Disponible en: <http://www.phac-aspc.gc.ca/labbio/res/psds-ftss/enterococcus-eng.php>. Revisado: 17/02/17.

Rahube, O. T., Marti, R., Scott, A., Tien, C. Y., Murray, R., Sabourin, L., Duenk, P., Lapen, R. D., and Topp, E. 2016. Persistence of antibiotic resistance and plasmid-associated genes in soil following application of sewage sludge and abundance on vegetables at harvest. Canadian Journal of Microbiology. 62(7):600-607.

- Ravaliya, K., Gentry-Shields, J., García, S., Heredia, N., de Aceituno, F. A., Bartz, E. F., Leon, S. J., and Jaykus, L. A. 2014. Use of *Bacteroidales* microbial source tracking to monitor fecal contamination in fresh produce production. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(2):612-617.
- Ray, B., and Bhunia, A. 2014. *Fundamental food microbiology*. Fifth Edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. Pp. 24, 29, 36, 276, 389, 425-429, 269.
- Redgrave, S. L., Sutton, B. S., Webber, A. M., and Piddock, V. J. L. 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Cell Press*. 22(8):438-445.
- Rehman, U. M., Zhang, H., Iqbal, K. M., Mehmood, K., Huang, S., Nabi, F. Luo, H., Lan, Y., and Li, J. 2017. Antibiotic resistance, serogroups, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from yaks with diarrhea in Qinghai Plateau, China. *Gut Pathogens*. 9:24.
- Rizk, E. D., and El-Mahdy, M. A. 2017. Emergence of class 1 to 3 integrons among members of *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Microbial Pathogens*. 112:50-56.
- Said, B. L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, A. C., Boudabous, A., Slama, B. K., and Torres, C. 2015. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*. 203:86-92.
- Schaufler, K., Semmler, T., Pickard, D., Toro, M., de la Cruz, F., Wieler, H. L., Ewers, C., and Guenther, S. 2016. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase plasmids does not reduce fitness but enhances virulence in some strains of pandemic *E. coli* lineages. *Frontiers in Microbiology*. 7:12.
- Schmidt, V. G., Møllerup, A., Christiansen, E. L., Stahl, M., Olsen, E. J., Angen, Ø. 2015. Sampling and pooling methods for capturing herd level antibiotic resistance in swine feces using qPCR and CFU approaches. *PLoS ONE*. 10(6):22.
- Schroeder, M., Brooks, D. B., and Brooks, E. A. 2017. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*. 8(39):1-23.

- Schwarz, S., and Johnson, P. A. 2016. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71:2066-2070.
- Shintani, M., Sanchez, K. Z., and Kimbara, K. 2015. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*. 6:16.
- Soborg, A. D., Hendriksen, B. N., Killan, M., and Kroer, N. 2013. Widespread occurrence of bacterial human virulence determinants in soil and fresh water environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(18):5488-5497.
- Soni, K. D., and Dubey, K. S. 2014. Phylogenetic analysis of the *Listeria monocytogenes* based on sequencing of 16S rRNA and *hlyA* genes. *Molecular Biology Reports*. 41:8219-8229.
- Sony, K. D., and Dubey, K. S. 2014. Phylogenetic analysis of the *Listeria monocytogenes* based on sequencing of 16S rRNA and *hlyA* genes. *Molecular Biology Reports*. 41:8219-8229.
- Strateva, T., Dimov, G. S., Atanosova, D., Petkova, V., Savov, E., and Mitov, I. 2015. Molecular genetic study of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy *Enterococcus* spp. isolates from Bulgaria. *Annals of Microbiology*. 1-7.
- Talebi, M., Sadeghi, J., Rahimi, F., and Pourshafie, R. M. 2015. Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(4):5.
- Tien, C. Y., Li, B., Zhang, T., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Marti, R., and Topp, E. 2017. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of the Total Environment*. 581:32-39.
- Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, A. N., and Handelsman, J. 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 42(111):15202-15207.

- Ukuku, O. D., Geveke, J. D., Chau, L., and Niemira, A. B. 2016. Microbial safety and overall quality of cantaloupe fresh-cut pieces prepared from whole fruit after wet steam treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 3-31.
- Ukuku, O. D., Huang, L., and Sommers, C. 2015. Efficacy of sanitizer treatments on survival and growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on fresh-cut pieces of cantaloupe during storage. *Journal of Food Protection*. 78(7):1288-1295.
- Uyttendaele, M., Jaykus, L. A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Korsten, L., Lau, M., McClure, P., Medema, G., Sampers, I., and Jasti, R. P. 2015. Microbial hazards in irrigation water: standars, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14:336-356.
- Van Duijkeren, E., Schink, K. A., Roberts, C. M., Wang, Y., and Schwarz, S. 2018. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbiology Spectrum*. 6(1):31.
- Veras, J. F., Simeão do Carmo, L. and Tong, C.L. 2008. A study of the enterotocigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 12:410-415.
- Vidal, E. J., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., and Navarro-García, F. 2007. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 49(5):376-386.
- Vidal, M., Kruger, E., Durán, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V., Toro, C., and Vidal, Ro. 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(10):5362-5365.
- Von Wintersdorff, H. J. C., Penders, J., van Niekerk, M. J., Mills, D. N., Majumder, S., van Alphen, B. L., Savelkoul, M. H. P., and Wolffs, G. F. P. 2016. Dissemination of

antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*. 7:173-183.

Walsh, A. K., Bennett, D. S., Mahovic, M., and Gould, H. L. 2015. Outbreaks associated with cantaloupe, watermelon, and honeydew in the United States, 1973-2011. *Foodborne Pathogens and Diseases*. 11(12):945-952.

Wang, F. R., Cao, W. W., and Cerniglia, E. C. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*. 83:727-736.

Wang, G., Manns, C. D., Churey, J. J., and Worobo, W. R. 2014. Naturally sensitive *Bacillus thuringiensis* EG10368 produces thurcin H and acquires immunity after heterologous expression of the one-step-amplified thurcin H gene cluster. *Journal of Dairy Science*. 97:4115-4119.

Wang, H., Sangwan, N., Li, Y. H., Su, Q. J., Oyang, Y. W., Zhang, J. Z., Gilbert, A. J., Zhu, G. Y., Ping, F., and Zhang, L. H. 2016. The antibiotic resistome of swine manure is significantly altered by association with the *Musca domestica* larvae gut microbiome. *International Society for Microbial Ecology*. 1-12.

Webb, C. C., Erickson, C. M., Davey, E. L., and Doyle, P. M. 2015. Evaluation of single or double hurdle sanitizer applications in simulated field of packing shed operations for cantaloupes contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Agriculture*. 5:231-244.

Woon, A. S., and Fisher, D. 2016. Antimicrobial agents – optimizing the ecological balance. *Medicine and the Future of Health*. 14:114-123.

Ye, H., Li, Y., Li, Z., Gao, R., Zhang, H., Wen, R., Gao, F. G., Hu, Q., and Geng, Y. 2016. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. *American Society for Microbiology*. 7(2)1-7.

Zurfuh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch-Inderbinen, M., Hächler, H., and Stephan, R. 2016. Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60(4):2594-2595.