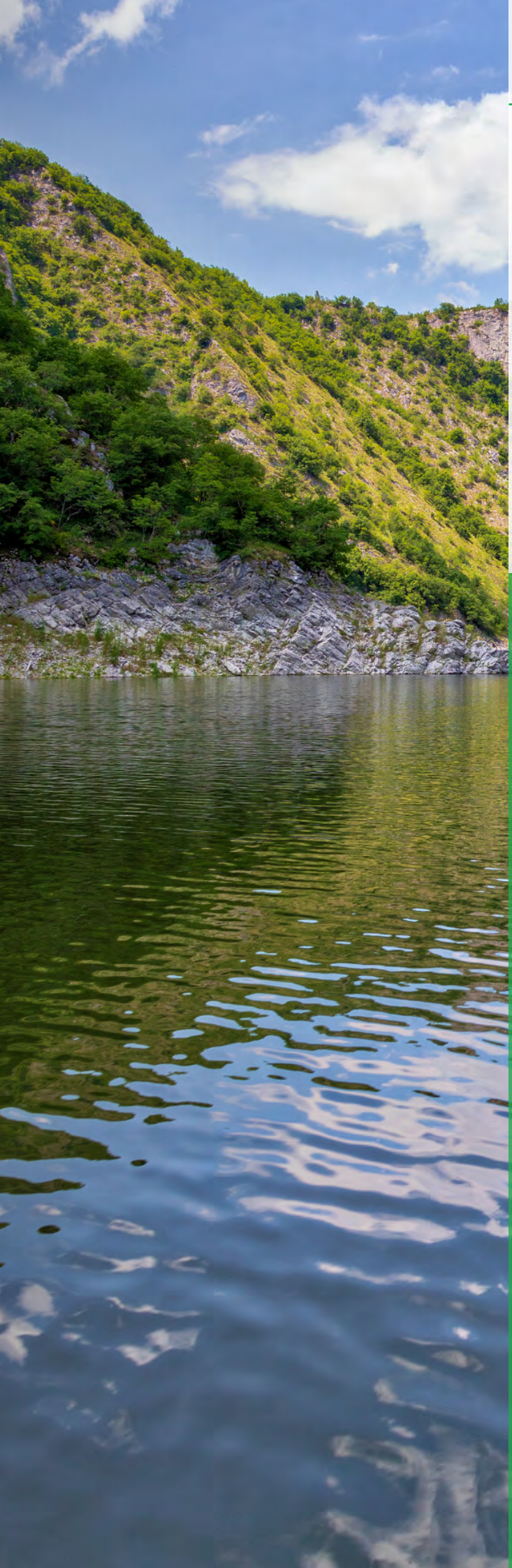


Plan Nacional
Resistencia
Antibióticos

Objetivos y estrategias para la vigilancia ambiental de determinantes bióticos de resistencia a los antibióticos

PRAN Medioambiente
Fase 2

Informe 2.1

MINISTERIO DE SANIDAD

agencia española de medicamentos y productos sanitarios

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)

Calle Campezo, 1, Edificio 8 • E-28022 Madrid
https://www.aemps.gob.es
https://resistenciaantibioticos.es

Fecha de publicación: Julio 2025
NIPO: 134-25-009-4

Se autoriza la reproducción del contenido de este informe siempre que la fuente sea reconocida.

Índice de contenidos

1. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos Medioambiente (PRAN-MA) 8
2. Resumen ejecutivo 11
3. Introducción 14
4. Métodos y dianas analíticas 17
   - 4.1. Métodos basados en cultivo bacteriano 18
   - 4.2. Métodos moleculares 20
     - 4.2.1. Análisis moleculares dirigidos (PCR, qPCR y HT-qPCR) 20
     - 4.2.2. Análisis moleculares no dirigidos (metagenómica) 22
5. Objetivos de vigilancia 25
6. Estrategias de vigilancia 27
   - 6.1. Vigilancia de los influentes de EDAR para protección de la salud pública 28
   - 6.2. Vigilancia de los efluentes de EDAR para la conservación de la calidad ambiental 30
     - 6.2.1. Eficacia de la EDAR en la eliminación de ARB y ARG 30
     - 6.2.2. Emisión de ARB y ARG a aguas superficiales a través de efluentes de depuradora 31
   - 6.3. Vigilancia de aguas regeneradas para la protección de la salud pública 32
   - 6.4. Vigilancia de aguas subterráneas y aguas recreacionales para la protección de la salud pública 34
   - 6.5. Vigilancia de biosólidos de depuradora para la protección de la salud pública y la conservación de la calidad ambiental 35
     - 6.5.1. Estudio epidemiológico de biosólidos de depuradora 36
     - 6.5.2. Emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas a través de biosólidos de depuradora 36
   - 6.6. Vigilancia de excretas de producción animal para la protección de la salud pública y la conservación de la calidad ambiental 38
     - 6.6.1. Presencia de ARB con potencial zoonótico en excretas de producción animal ... 38
     - 6.6.2. Emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas a través de excretas de producción animal 39
   - 6.7. Vigilancia de animales de vida libre y fauna sinantrópica para la conservación de la calidad ambiental 40
   - 6.8. Vigilancia del aire para la conservación de la calidad ambiental 42
7. Conclusiones 43
8. Anexo I. Epidemiología de aguas residuales de SARS-CoV-2 y la monitorización de resistencias a los antibióticos 46
9. Bibliografía 49

Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de la utilización de métodos basados en cultivo (adaptada de Liguori K. et al. 2023) 19

Tabla 2. Bacterias indicadoras recomendadas en la utilización de métodos basados en cultivo 19

Tabla 3. Principales ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares basadas en PCR aplicadas a las muestras ambientales 22

Tabla 4. Principales ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares basadas en metagenómica para muestras ambientales 24

Tabla 5. Esquema de vigilancia de influentes de EDAR para protección de la salud pública 29

Tabla 6. Esquema de vigilancia de efluentes de EDAR para evaluar la eficacia de la misma en la eliminación de ARB y ARG 31

Tabla 7. Esquema de vigilancia de efluentes de EDAR para evaluar el impacto sobre el medio receptor 32

Tabla 8. Esquema de vigilancia de aguas regeneradas 33

Tabla 9. Esquema de vigilancia de aguas subterráneas y recreacionales 34

Tabla 10. Esquema de vigilancia de biosólidos de depuradora para protección de la salud pública 36

Tabla 11. Esquema de vigilancia de biosólidos de depuradora para evaluar la emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas 37

Tabla 12. Esquema de vigilancia de excretas de producción animal para determinar la presencia de ARB con potencial zoonótico 39

Tabla 13. Esquema de vigilancia de excretas de producción animal para evaluar la emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas 40

Tabla 14. Esquema de vigilancia de animales de vida libre y fauna sinantrópica 41

Tabla 15. Esquema de vigilancia del aire en entornos cercanos a la fuente de emisión 42

La información incluida en este documento representa la revisión realizada por los autores y no debe entenderse como posición de las Agencias u Organizaciones en las que trabajan.

Se autoriza la reproducción del contenido de este informe siempre que la fuente sea reconocida.

Cita sugerida: Plan Nacional Frente a la Resistencia a los Antibióticos Medioambiente (PRAN-MA) 2023. INFORME PRAN-MA 2.2: RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES Y AGUAS SUPERFICIALES. NIPO: 134-25-009-4

Autores

GRUPO DE TRABAJO DE RESISTENCIAS EN EL MEDIOAMBIENTE

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

HARO CASTUERA, Amparo
Área de Evaluación de Riesgos Ambientales. Departamento de Medicamentos Veterinarios, AEMPS.

DE LA CASA RESINO, Irene
Área de Evaluación de Riesgos Ambientales, Departamento de Medicamentos Veterinarios, AEMPS.

LABURU DAÑOBEITIA, Ane
Unidad de Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) en medioambiente.

CARAPETO GARCÍA, RICARDO
Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) en medioambiente.

Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA).

BORREGO MORÉ, Carles
Profesor de investigación (ICRA); Profesor Titular de Microbiología (Universitat de Girona).

Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria - Centro de Investigación en Sanidad Animal (IRTA-CReSA).

MIGURA GARCÍA, Lourdes
Investigadora en IRTA-CReSA.

Universidad de La Rioja.

TORRES MANRIQUE, Carmen
Catedrática de la Universidad de La Rioja. Coordinadora del grupo de investigación: Resistencia a los Antibióticos desde el enfoque One Health (One Health-UR).

Revisores

Unidad de Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos.

LÓPEZ NAVAS, Antonio
Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos. Salud Humana

MUÑOZ MADERO, Cristina
Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos. Sanidad Animal

J. VILAR, María
Unidad de Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) en sanidad animal.

SANTACREU GARCÍA, María
Unidad de Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) en comunicación.

CASADO BOLAÑOS, Natalia
Unidad de Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) en comunicación.

MACARRO MARTÍN, Noelia
Unidad de Coordinación del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) en comunicación.

PRAN

1. PLAN NACIONAL FRENTE A LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS MEDIOAMBIENTE (PRAN-MA)

La aparición y propagación de determinantes de resistencia – *i.e* bacterias resistentes (ARB, por sus siglas en inglés) y genes de resistencia a los antibióticos (ARG, por sus siglas en inglés) –, constituye una de las amenazas más graves a las que se enfrenta la salud pública y la sanidad animal hoy en día. No obstante, aunque los mayores problemas se observan en el entorno clínico, el medioambiente (MA) desempeña un papel fundamental en la emergencia y diseminación de dichas resistencias.

El medioambiente (MA) desempeña un papel fundamental en la emergencia y diseminación de determinantes de resistencia antimicrobiana

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del papel del MA en la emergencia y transferencia de resistencias a los antibióticos, en el año 2019, el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) crea el Grupo de Trabajo de Resistencias en el MA (PRAN-MA) con los siguientes objetivos específicos:

- Identificar qué áreas de conocimiento son de interés en lo referente al papel de las resistencias en el MA;
- Avanzar en el desarrollo de herramientas que permitan categorizar riesgos para la salud pública y la sanidad animal;
- Elaborar un informe de conclusiones que permita desarrollar acciones futuras.

Para cumplir con los objetivos planteados, se desarrolló un plan de trabajo que comenzó durante el PRAN 2019-2021, y se dividió en 3 fases:

- **Fase 1:** Identificación de los puntos de emisión de determinantes de resistencias al MA y la caracterización del comportamiento medioambiental de los antibióticos de mayor uso en salud humana y sanidad animal. Como resultado de esta primera fase se elaboraron los siguientes informes:
  - Informe 1.1: Estudio de las principales fuentes de emisión, rutas de dispersión y vías de exposición a los antimicrobianos, bacterias resistentes y genes de resistencia antimicrobiana para personas y animales.
  - Informe 1.2: Destino y comportamiento ambiental de antimicrobianos y su relevancia en la resistencia.
- **Fase 2:** Estudio de los datos de monitorización ambiental y posibles mejoras de los planes de vigilancia. Esta fase incluye los siguientes informes, entre los que se encuentra el presente documento:
  - Informe 2.1: Objetivos y estrategias para la vigilancia ambiental de determinantes bióticos de resistencia a los antibióticos.
  - Informe 2.2: Monitorización de residuos de antibióticos en estaciones depuradoras de aguas residuales y aguas superficiales.
- **Fase 3:** Evaluación de las metodologías de análisis de riesgos y estudio del posible impacto de los determinantes de resistencia en el MA en salud pública y sanidad animal.

Actualmente, el grupo de trabajo de resistencias en el MA está formado por personal perteneciente a centros de investigación y de otras administraciones públicas. Es un grupo dinámico que se actualiza con expertos en la materia de interés en cada momento. Este informe, que se corresponde con la fase 2.1 del plan de trabajo del PRAN-MA en la que se estudian distintas metodologías de análisis de determinantes de resistencia, así como los principales objetivos y estrategias de vigilancia, se enmarca dentro de la línea estratégica de vigilancia del PRAN. Han participado expertos del Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA), del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria - Centro de Investigación en Sanidad Animal (IRTA-CReSA), de la Universidad de La Rioja (UR) y de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

PRAN

2. RESUMEN EJECUTIVO

El MA es el medio receptor al que llegan los residuos de antibióticos, las bacterias y los genes de resistencia fruto de las actividades humanas y animales, interviniendo de forma compleja en la emergencia y diseminación de resistencias. En este sentido, los **programas de vigilancia ambiental** de determinantes de resistencia (ARB y ARG) pueden mejorar sustancialmente nuestra compresión de este fenómeno.

Dichos programas de vigilancia se deben establecer en base a unos objetivos prefijados como son la **protección de la salud pública**, o la **conservación de la calidad ambiental**. En función de estos objetivos, estableceremos la metodología e indicadores (ARB o ARG) más adecuados para cada caso.

Con respecto a la **metodología**, las opciones principales son el cultivo en medidos selectivos, la PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*) y la metagenómica. En cuanto a los **indicadores**, se refieren a cepas bacterianas centinelas utilizadas para monitorizar la propagación de la resistencia en diversos entornos (e.g. *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido -*E. coli* BLEE-) así como a genes de resistencia y estructuras genéticas de integración y movilización que permiten la dispersión de dichos genes de resistencia. Estos permiten a las bacterias evadir o neutralizar el efecto de los antibióticos, por lo que su identificación es crucial para entender cómo se desarrollan los mecanismos de resistencia y cómo se pueden vincular a ciertos perfiles de resistencia. Tanto la metodología como los indicadores se deben seleccionar de acuerdo con los objetivos del programa de vigilancia.

A su vez, deben definirse claramente las distintas **estrategias de vigilancia** en función de los objetivos planteados. Así, la vigilancia de **aguas** residuales, superficiales, subterráneas, regeneradas y recreacionales constituye una fuente de información muy relevante ya que:

- Los influentes de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) permiten conocer los mecanismos de resistencia circulantes y caracterizar la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia, estudiar su prevalencia a nivel comunitario y geográfico, así como realizar comparaciones con lo observado en los efluentes de "puntos calientes" para la emisión ambiental de resistencias como hospitales, industrias farmacéuticas o granjas.
- Los efluentes de EDAR junto a los influentes, permiten evaluar la eficacia en la eliminación de ARB y ARG durante el proceso de depuración, así como evaluar el grado de contaminación ambiental que se está emitiendo a través de los efluentes (en términos de ARB y ARG).
- El medio receptor de los efluentes, principalmente ríos y otras masas de aguas, proporciona información sobre el estado de las aguas superficiales a las que humanos, animales y MA estamos expuestos además de facilitar la diseminación de ARB y ARG.
- Las aguas regeneradas, sobre todo, las utilizadas para el regadío, son útiles para analizar la propagación de ARB y ARG en los ecosistemas agrícolas y valorar la posible

diseminación de los mismos a través de la cadena alimentaria.

- Las aguas subterráneas y recreacionales, por su parte, son buenos indicadores de los riesgos para la salud pública ya que pueden constituir un punto de exposición directa a humanos y animales al ser ingeridas.

Por otra parte, la vigilancia de lodos de depuradora o **biosólidos** proporciona información sobre los contaminantes químicos y biológicos presentes en el agua residual. Su vigilancia, nos puede dar información sobre la difusión de ARB y ARG a suelos agrícolas, permitiendo reducir el riesgo de diseminación de resistencias en los mismos y asegurar un uso seguro de los biosólidos como fertilizantes. A su vez, los biosólidos tienen un papel importante para realizar estudios epidemiológicos, ya que actúan como sumideros de contaminantes, bacterias y genes de resistencia, lo que puede ser muy útil para futuros estudios retrospectivos.

La vigilancia ambiental de resistencias que provienen de **excretas de producción animal** proporciona información de los microorganismos zoonóticos (resistentes o no) con importancia crítica para la salud pública, así como de la emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas.

Para la vigilancia de transmisión de resistencias mediada por **animales de vida libre**, es muy importante definir el objetivo de la información que queremos obtener ya que condicionará la especie centinela a utilizar. Así, se pueden considerar aves migratorias o no migratorias que viven en ambientes antropizados según la distancia de transmisión que queramos abordar. Igualmente ocurre con los mamíferos. En este caso, se puede optar por especies que viven en ambientes antropizados/zonas de alta densidad ganadera o no. También se pueden seleccionar especies acuáticas de vida libre para detectar genes de resistencia como centinelas e indicadores de la salud del sistema. En este caso, especies filtradoras como los bivalvos de agua dulce son buenos candidatos.

Además, la vigilancia del **aire** como vector de transmisión de resistencias, es de interés en entornos cercanos a sus fuentes de emisión tales como granjas y EDAR, entre otros.

En este informe se resumen las distintas metodologías y dianas analíticas más relevantes acorde al conocimiento científico actual. A su vez, se indican los objetivos clave que debe perseguir un programa de vigilancia, así como las estrategias de vigilancia necesarias para cumplir con los objetivos. Se pretende describir las principales estrategias de vigilancia posibles, aunque la relevancia relativa de cada una de ellas no está contemplada en el alcance de este informe. Así mismo, se incluyen numerosas tablas resumen de los distintos esquemas de vigilancia a fin de mostrar de forma sencilla las posibilidades de vigilancia en función de los objetivos y los medios disponibles.

Por último, es importante destacar que, actualmente, la puesta en marcha de cualquier programa de vigilancia ambiental se puede beneficiar del impulso que ha tenido estos últimos años la epidemiología de las aguas residuales para estimar la circulación comunitaria del virus SARS CoV-2. Se pueden aprovechar los sistemas creados a nivel nacional y/o local, y buscar las sinergias para facilitar el comienzo de programas sistemáticos de vigilancia de resistencia en aguas residuales que permitirán anticiparse a nuevas pandemias.

PRAN

3. INTRODUCCIÓN

La vigilancia comprende las operaciones sistemáticas y continuas de recogida, comparación y análisis de datos sanitarios y la difusión de información en tiempo oportuno para tomarse medidas.

La vigilancia medioambiental de determinantes bióticos de resistencia (ARB y ARG) puede mejorar nuestra comprensión sobre cómo estas resistencias se diseminan en el MA, siendo de utilidad para reducir las lagunas de conocimiento

Por tanto, la vigilancia medioambiental de determinantes bióticos de resistencia (ARB y ARG) puede mejorar nuestra comprensión sobre cómo estas resistencias se diseminan en el MA, siendo de utilidad para reducir las lagunas de conocimiento en tres ámbitos de especial relevancia:

- Mayor comprensión de las dinámicas de transmisión de resistencias en el interfaz humano –animal– MA.
- Conocimiento de la situación a nivel comunitario mediante el estudio epidemiológico de resistencias en aguas residuales.
- Descubrimiento de nuevas variantes de genes de resistencias que pudieran aparecer en hospitales, industrias farmacéuticas o granjas, entre otros.

Recientes iniciativas europeas acentúan la necesidad de contar con sistemas de vigilancia de ARB y ARG. Así, la Estrategia Europea de Medicamentos en el Medioambiente (EC 2019) y el Plan de Acción Europeo de Resistencias a los Antimicrobianos (EC 2017) remarcan la importancia de mejorar la toma de datos, la vigilancia y la monitorización ambiental de genes y bacterias resistentes.

Estas estrategias están formalizándose reglamentariamente a través de la revisión de varias Directivas que han sido adoptadas o lo serán próximamente. La actualización de la Directiva de Aguas Residuales Urbanas (Directiva (UE) 2024/3019), publicada en diciembre de 2024, establece en su artículo 17(3) que las aglomeraciones urbanas de más de 100.000 h-e deben controlar la resistencia a los antimicrobianos en las aguas residuales urbanas. De manera análoga, las propuestas de enmienda de la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000 /60/CE), de la Directiva de Aguas Subterráneas (Directiva 2006/118/CE) y de la Directiva de Normas de Calidad Ambiental de la Aguas (Directiva 2008/105/CE) establecerán una lista de observación de indicadores de resistencias a los antimicrobianos.

No obstante, la puesta en marcha de un programa de vigilancia de resistencias en el MA no es sencilla y requiere de un esfuerzo multidisciplinar para definir en qué lugares, cuándo, qué y con qué frecuencia y objetivo se debe realizar dicha vigilancia ambiental. Además, para que los datos obtenidos sean fiables, robustos y comparables, se debe trabajar en la estandarización de protocolos de muestreo y análisis, y la definición de indicadores y concentraciones aceptables. En este sentido, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la institución norteamericana Water Research Foundation (WRF), han propuesto una serie de indicaciones y protocolos estandarizados para poder llevar a cabo una vigilan-

cia en los tres compartimentos que se consideran en el contexto de “Una sola salud” i.e. humanos, animales y medioambiente.

Para que los datos obtenidos de los programas de vigilancia de resistencias en el MA sean fiables, robustos y comparables, se debe trabajar en la estandarización de protocolos de muestreo y análisis

La OMS, a través del protocolo “Tricycle” (WHO 2021) propone la monitorización de *E. coli* BLEE como indicador de las resistencias a antibióticos tanto en salud humana (hospitales), animal (granjas y cadena alimentaria) y ambiental (ríos impactados). Este protocolo destaca por la relativa facilidad del análisis que plantea, lo que permite su implementación en programas de vigilancia ambiental llevados a cabo globalmente, incluido en países de renta media-baja. Por su parte, la WRF ha publicado recientemente un extenso documento en el que se revisan y examinan los pros y contras de los diferentes métodos analíticos disponibles, y se propone una serie de microorganismos y genes indicadores para la monitorización fiable del nivel de resistencias en sistemas acuáticos (Liguori K. et al. 2023).

Con el objetivo de sentar las bases para desarrollar futuros programas de vigilancia ambiental en el marco de la línea estratégica de vigilancia del PRAN, este informe detalla los distintos objetivos de vigilancia que pueden plantearse, así como las estrategias necesarias para alcanzarlos. Se describen las metodologías disponibles para analizar los determinantes bióticos de resistencia, junto con su utilidad, ventajas y limitaciones. Además, se proponen las bacterias y genes de resistencia a analizar para cada estrategia, basándonos en el conocimiento actual.

Decidir cuál es la estrategia más adecuada es un proceso complejo que requiere evaluar factores como los objetivos específicos, los recursos económicos disponibles y las fuentes de datos accesibles. En este contexto, se plantea un enfoque de muestreo estratificado para cada uno de los objetivos definidos en este informe, considerando distintos puntos de muestreo.

El trabajo desarrollado en este informe pretende describir las principales estrategias de vigilancia disponibles actualmente, dejando la discusión sobre su relevancia relativa para la implementación de un sistema de vigilancia ambiental en la fase 3 del PRAN-MA.

PRAN

4. MÉTODOS Y DIANAS ANALÍTICAS

Para vigilar de forma eficiente y comparable el perfil de resistencias a antibióticos de un ambiente determinado, se requiere disponer de una metodología analítica lo más específica y estandarizada posible, así como identificar aquellos microorganismos o genes que puedan ser analizados de manera precisa y rutinaria, y que sean útiles como indicadores. A continuación, se explican brevemente las ventajas y limitaciones de los principales métodos analíticos en relación con la vigilancia ambiental de dianas de elevado interés.

4.1. MÉTODOS BASADOS EN CULTIVO BACTERIANO

El cultivo bacteriano está dirigido a la detección y evaluación de la presencia de bacterias resistentes en diferentes entornos, así como a su posterior caracterización. Su principal ventaja es que permite confirmar la viabilidad de los microorganismos presentes en la muestra, además de ofrecer la posibilidad de obtener y almacenar las bacterias aisladas para posteriores estudios avanzados desde una perspectiva de "Una sola salud" (Tabla 1). Estos estudios más avanzados pueden ofrecer información fenotípica y genotípica relevante mediante la investigación de los perfiles de resistencia, el cribado de los genes de resistencia de interés, el estudio de los linajes genéticos de las bacterias aisladas o la secuenciación de sus genomas completos. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo estudios de correlación o concordancia entre fenotipo y genotipo, realizar estudios epidemiológicos y filogenéticos entre aislados provenientes de diferentes ambientes dentro del contexto de "Una sola salud", u obtener evidencias de nuevos mecanismos de resistencia o información sobre la transmisión de los genes de resistencia (si estos se encuentran en elementos móviles, bien sean plásmidos, transposones o secuencias de inserción, entre otros). Por el contrario, las limitaciones de los métodos basados en cultivo están relacionadas con la gran diversidad bacteriana en el MA, no disponiendo de medios de cultivo específicos para todas las especies posibles.

La OMS recomienda el aislamiento por cultivo de *E. coli* BLEE como bacteria indicadora de resistencia clave en el contexto de "Una sola salud"

Los medios de cultivo convencionales están principalmente diseñados para el aislamiento de microorganismos patógenos u oportunistas en los ámbitos clínicos y alimentarios, por lo que, la mayoría de las especies bacterianas de origen ambiental son difícilmente cultivables. Por este motivo, la vigilancia basada en cultivo debería centrarse en bacterias comensales y patógenas oportunistas capaces de sobrevivir en el MA (*e.g. E. coli, Enterococcus spp., Acinetobacter spp., Pseudomonas spp., y/o Aeromonas spp.*).

Considerando estas limitaciones, la OMS, a través del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (conocido como GLASS, por sus siglas en inglés) recomienda el aislamiento por cultivo de *E. coli* BLEE como indicador de relevancia en el contexto de "Una sola salud" (WHO 2021). Además, se propone el aislamiento de *Enterococcus faecalis/faecium* como bacteria Gram positiva

indicadora de resistencia, especialmente de aquellos microorganismos resistentes a la vancomicina o al linezolid (Tabla 2). Los medios de cultivo para estos dos microorganismos están debidamente estandarizados (Liguori K. et al. 2023).

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de la utilización de métodos basados en cultivo (adaptada de Liguori K. et al. 2023)

Ventajas
1. Confirmación de la viabilidad de los microorganismos presentes en la muestra. 2. Bacterias de relevancia clínica. 3. Caracterización fenotípica estandarizada. 4. Caracterización de cepas con diversas aplicaciones como: • Estudio de linajes, • Estudios epidemiológicos, • Estudio de genes de resistencia, • Estudio de elementos genéticos móviles, • Estudios de correlación fenotipo-genotipo. 5. Introducción directa en modelos de evaluación de riesgo. 6. Bajo coste.
Inconvenientes
1. Limitado a bacterias comensales y patógenas oportunistas dada la carencia de medios de cultivo específicos para la mayoría de las especies de bacterias de origen ambiental. 2. Falta de puntos de corte para interpretar el resultado de la caracterización fenotípica estandarizada en un elevado número de combinaciones bacteria / antibiótico. 3. Aumento del coste si es necesario realizar análisis genómicos posteriores.

Tabla 2. Bacterias indicadoras recomendadas en la utilización de métodos basados en cultivo*

Clase	Grupo
E. coli BLEE.	Alineada con la recomendación de la OMS como indicador en el contexto de "Una sola salud" debido a que i) es una bacteria resistente diseminada por humanos, animales y MA, ii) su tasa de aparición se reduce al reducir el consumo de antimicrobianos y iii) las BLEE confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica (WHO 2021).
Enterococcus faecalis/faecium resistente a vancomicina y linezolid.	Debido a que i) *Enterococcus faecalis/faecium* es una bacteria G+ comensal en el intestino de personas y animales, muy frecuente en el MA e importante patógeno oportunista, y ii) Las resistencias señaladas se han descrito en el ecosistema humano, animal y ambiental y son de gran relevancia clínica (Alister et al. 2020).

*Para la detección y cuantificación de estas bacterias resistentes se deben usar medios de cultivo selectivos suplementados con antibióticos o medios cromogénicos específicos.

4.2. MÉTODOS MOLECULARES

A diferencia de los métodos basados en cultivo, los métodos moleculares están dirigidos a la detección, identificación y cuantificación de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos y aportan información sobre su abundancia y prevalencia en una muestra concreta.

Los métodos moleculares están dirigidos a la detección, identificación y cuantificación de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos

La principal ventaja de los métodos moleculares es que permiten obtener esta información sin necesidad de cultivar los microorganismos en el laboratorio, lo que soluciona el problema de la baja cultivabilidad de la mayoría de los microorganismos (Tabla 3).

Sin embargo, el principal inconveniente de estos métodos es que no permiten, en la mayoría de los casos, identificar ni a qué microorganismo pertenece el gen identificado (a no ser que se lleve a cabo una secuenciación híbrida que conlleva un coste elevado), ni si dicho microorganismo es viable o no. Además, la aplicación de cualquiera de estos métodos necesita de una serie de pasos previos, entre ellos la extracción del ADN de la muestra problema. Esta extracción no siempre es fácil y, dependiendo del tipo de muestra, puede requerir de una optimización previa para obtener la suficiente cantidad y calidad de ácidos nucleicos (ADN, ARN, o ambos) para abordar con éxito los análisis previstos. Por otra parte, muchas muestras –sobre todo las ambientales– contienen substancias que pueden interferir o inhibir los análisis posteriores (por ejemplo, la PCR) con lo que una purificación adecuada es imprescindible. En este sentido, la oferta de kits comerciales para la extracción del ADN o del ARN de todo tipo de muestras (cultivo, heces, esputo, suelos, sedimentos, aguas, etc.) es muy variada y el uso de uno u otro depende del tipo de muestra, del tipo de análisis y de las preferencias del analista en base a su experiencia previa. Hoy en día, el abanico de herramientas moleculares disponibles para identificar y cuantificar un gen diana es amplio y podemos escoger la herramienta que mejor se adapte a los objetivos de nuestro estudio.

Los diferentes métodos moleculares presentan a su vez ventajas e inconvenientes, algunos transversales a todas las técnicas y otros más específicos (ver apartados siguientes).

4.2.1. Análisis moleculares dirigidos (PCR, qPCR y HT-qPCR)

Los análisis basados en PCR permiten detectar (PCR estándar) o cuantificar (PCR cuantitativa, o qPCR) los genes de una muestra determinada, aun encontrándose a concentraciones muy bajas, dado que cada ciclo de reacción duplica el número de copias del gen diana, amplificando exponencialmente su abundancia. Esta capacidad de amplificación dota a la técnica de una gran sensibilidad que se suma a la gran especificidad de la misma debida a la complementariedad de bases entre el ADN diana (el gen en cuestión) y los cebadores (pequeños oligonucleótidos complementarios a las regiones que flanquean el fragmento del gen a amplificar) utilizados para éste. Hay que destacar que ambas propiedades también añaden un elevado riesgo de contaminación e inhibición de la reacción (Roux 2009).

La detección o cuantificación de genes de resistencia mediante PCR requiere de un diseño previo y optimización del test para el gen diana a estudiar, lo que incluye tanto el diseño de los cebadores como de las condiciones de la reacción (temperatura de hibridación, número de ciclos, límites de detección y cuantificación, etc.). La optimización de estas variables no es fácil y puede llevar tiempo. En todo caso, el número de protocolos de PCR (o qPCR) ya desarrollados para muchos de los genes de resistencia de mayor relevancia clínica y

ambiental es elevado, lo que ofrece un potencial analítico enorme sea cual sea el objetivo del estudio (Tabla 3).

Recientemente se ha desarrollado una técnica de PCR de alta resolución (HT-qPCR, del inglés High-Throughput qPCR) basada en microfluídica que permite la detección y cuantificación de centenares de genes en un solo análisis (Lamas et al. 2016; Sandberg et al. 2018; Waseem et al. 2020; Ishii 2020). Estos sistemas constituyen una herramienta revolucionaria por su versatilidad y adaptabilidad, además de por el ahorro de tiempo de análisis, pero requieren una considerable experiencia para adecuar el diseño del análisis (nº de genes × nº de muestras) y un equipamiento sofisticado. El mercado ofrece varias opciones para este tipo de instrumental y, lo que es más interesante, algunas compañías ya ofrecen plataformas de análisis de genes de resistencia a la carta para cualquier tipo de muestra. Como ejemplo, hay compañías que ofrecen una plataforma de análisis de genes de resistencia por HT-qPCR adaptable a las necesidades del usuario, tanto en número de genes diana como en número de muestras. En este caso, el usuario solo envía las extracciones de ADN de las muestras problema, y la compañía devuelve la abundancia relativa de los genes analizados en cada muestra para su interpretación.

La principal limitación de todas las técnicas basadas en la PCR es que, al tratarse de un análisis dirigido, requiere de la selección previa del gen o genes a analizar de entre todos los posibles. Esto implica no solo tener claros los objetivos del estudio, sino también disponer de un conocimiento previo sobre la muestra a analizar. Este conocimiento previo puede ser completo, si la muestra en cuestión es una cepa bacteriana aislada de la que ya conocemos su perfil de resistencias, o muy limitado si se trata de una muestra ambiental (por ejemplo, un tramo de río o un suelo agrícola) donde desconocemos no sólo la diversidad bacteriana de la misma sino también la contaminación que recibe el sistema. En este último caso, tanto la diversidad total de genes de resistencia en la muestra (el llamado “resistoma”) como su abundancia puede llegar a ser muy alta, con lo que cualquier selección a priori de los genes a analizar ofrecerá una imagen limitada - y quizás sesgada - de la situación real del sistema.

Por tanto, la selección de los genes a analizar debe responder a criterios científicos (qué genes tienen más interés en el contexto del estudio), logísticos (capacidad analítica y tiempo) y, por supuesto, económicos (presupuesto disponible). En este sentido, la ausencia de referencias claras a las que dirigirse para realizar dicha selección – no existen hasta la fecha genes de resistencia que puedan considerarse indicadores óptimos para el diagnóstico ambiental (en clara analogía a lo que sería *E. coli* como indicador de contaminación fecal en el control de la calidad microbiológica de aguas) – es una seria limitación a la hora de realizar un diagnóstico preciso del perfil de resistencias del ambiente muestreado.

Los análisis moleculares dirigidos ofrecen un enorme potencial analítico en el diagnóstico ambiental de genes de resistencia

Asimismo, tampoco están definidas las concentraciones de genes de resistencia a partir de las cuales un ambiente determinado (agua o suelo) pueda representar un riesgo para la salud animal o humana. Esto deriva del hecho de que un resultado positivo para un gen concreto, sea por PCR o metagenómica (ver a continuación), no aporta información acerca de la viabilidad del microorganismo que contiene ese gen, con lo que el riesgo de infección es difícil de evaluar (Manaia 2017).

Tabla 3. Principales ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares basadas en PCR aplicadas a las muestras ambientales

Ventajas
1. Independencia de la baja cultivabilidad de la mayoría de los microorganismos. 2. Alta sensibilidad y especificidad. 3. Rapidez. 4. Equipamiento asequible (PCR estándar). 5. Cuantificación precisa (en términos absolutos, qPCR). 6. Abundancia relativa (qPCR y HT-qPCR permiten cuantificar el gen 16S rRNA, como indicador de la abundancia bacteriana en la muestra). 7. Amplia capacidad y versatilidad analítica (análisis de 250-350 genes en una sola carrera (HT-qPCR).
Inconvenientes
1. Problemas de inhibición y contaminación. 2. Falta de información sobre viabilidad. 3. Análisis dirigido (requiere selección previa de los genes diana a analizar). 4. Mayor coste en comparación con los métodos basados en cultivo. 5. Dependencia de la disponibilidad de métodos optimizados para cada gen diana. 6. Necesidad de equipamiento especializado. 7. Necesidad de experiencia avanzada. 8. Ausencia de métodos estandarizados. 9. Dificultad para evaluar el riesgo de infección.

4.2.2. Análisis moleculares no dirigidos (metagenómica)

A diferencia de los métodos basados en PCR, los análisis por metagenómica ofrecen dos ventajas: i) no es necesario seleccionar previamente las dianas a analizar y ii) se identifican todos los genes de resistencia presentes en la muestra si la profundidad de la secuenciación es suficiente (Tabla 4). Además, como la secuenciación se realiza, sobre todo, en el ADN de la muestra sin preselección, las secuencias resultantes (entre decenas y cientos de millones en función de la técnica utilizada) pueden analizarse las veces que se desee en función del objetivo del análisis (genes de resistencia a antibióticos, resistencia a metales, elementos genéticos móviles, marcadores filogenéticos, etc.). Por otra parte, y aunque las secuencias resultantes ("reads") son cortas (entre 100 y 300 nucleótidos en función de la técnica), el análisis bioinformático posterior permite obtener secuencias de mayor longitud ("contigs") a partir de la alineación y solapamiento de los "reads" originales. El análisis de estos "contigs" permite identificar el entorno genético de los genes diana e identificar su origen (por ejemplo, si es cromosómico o plasmídico) e, incluso, el microorganismo origen. Actualmente, existen tecnologías de secuenciación que producen secuencias de mayor longitud que facilitan el ensamblaje de genomas completos. La combinación de ambas tecnologías (secuencias cortas y largas, también denominada secuenciación híbrida) permite completar con precisión genomas y plásmidos de muestras ambientales.

El desarrollo de protocolos estandarizados basados en metagenómica podría revolucionar el estudio de los genes de resistencia en muestras ambientales

La metagenómica, sin embargo, tampoco está exenta de limitaciones (Tabla 4), algunas pro-

pias de las técnicas moleculares y otras más específicas. Entre estas últimas destacan:

- la necesidad de disponer de bases de datos de referencia con las que comparar las secuencias problema;
- la cuantificación, aunque posible, no deja de ser relativa en función del número total de "reads", del número de genes de copia única o bien del número de genes del 16S rRNA (una manera de relativizar en función de la abundancia bacteriana);
- la necesidad de equipamiento sofisticado (secuenciadores) y de una capacidad de computación notable para realizar el análisis bioinformático posterior, y
- la necesidad de poseer conocimientos avanzados en bioinformática para el análisis e interpretación de los datos.

Al igual que en el caso de la HT-qPCR, muchas compañías ofrecen servicios de secuenciación a la carta (diferentes plataformas, profundidad de análisis, etc.) que permiten a un usuario que no dispone del instrumental necesario analizar sus muestras mediante metagenómica o metatranscriptómica (secuenciación de los ARN mensajeros para estudios de expresión génica) solo enviando el ADN (o ARN) de sus muestras. En todo caso, el coste es muy superior a un análisis tradicional por qPCR y varía en función de la profundidad del análisis y la técnica aplicada. No obstante, la información que se obtiene supera en varios órdenes de magnitud la de los métodos basados en PCR y, por tanto, la relación información-precio es favorable. Por lo tanto, la utilización de una u otra técnica debe estar en función de los objetivos del estudio a abordar.

Otra de las limitaciones de la metagenómica es su dificultad para detectar genes que se encuentran en cantidades muy bajas si no se utiliza una profundidad de análisis muy alta (es decir, muchos millones de secuencias por muestra). Para superar este problema se han desarrollado algunas técnicas que se basan en la captura de las secuencias problema y su amplificación previa para incrementar su abundancia antes de secuenciar (Lanza et al. 2018).

La información que se obtiene supera en varios órdenes de magnitud la de los métodos basados en PCR y, por tanto, la relación información-precio es favorable

Finalmente, hay que destacar también que otra de las limitaciones de la metagenómica para el diagnóstico ambiental es la ausencia de métodos estandarizados que permitan un análisis homogéneo de las muestras y una comparativa robusta entre los resultados obtenidos por diferentes laboratorios. La gran diversidad en cuanto a técnicas de secuenciación (Illumina, PacBio, Nanopore), flujos bioinformáticos para el análisis posterior, así como las diferentes bases de datos de referencia (CARD, ResFinder, DeepArg-db, entre otras), son variables que se deben uniformizar para conseguir un protocolo estandarizado de trabajo que permita obtener resultados comparables. Este es un factor clave a la hora de abordar un programa de vigilancia del resistoma ambiental que sea útil desde el punto de vista de la salud pública. En la actualidad, son varios los grupos de investigación que están trabajando en este sentido (Liguori et al. 2022; Davis et al. 2023).

Tabla 4. Principales ventajas e inconvenientes de las técnicas moleculares basadas en metagenómica para muestras ambientales

Ventajas
1. Independencia de la baja cultivabilidad de los microorganismos. 2. Análisis no dirigido (sin necesidad de seleccionar a priori los genes diana). 3. Caracterización completa de la comunidad. Entre otros: – Composición taxonómica y genes de resistencia y virulencia, – Elementos genéticos móviles. 4. Capacidad de análisis en función de la necesidad. 5. Capacidad para relacionar genes concretos con microorganismos concretos.
Inconvenientes
1. Falta de información sobre viabilidad. 2. Dependencia de la disponibilidad de bases de datos de referencia. 3. Necesidad de conocimientos avanzados para el análisis e interpretación de los datos. 4. Coste elevado. 5. Falta de disponibilidad de métodos estandarizados. 6. Necesidad de alta capacidad computacional. 7. Dificultad para evaluar el riesgo de infección.

PRAN

5. OBJETIVOS DE VIGILANCIA

Con el fin de sacar el máximo partido a un programa de vigilancia ambiental es preciso, en primer lugar, establecer cuáles van a ser los objetivos de dicho programa, a fin de que las estrategias de vigilancia se alineen de acuerdo a los mismos.

El primer objetivo que debería perseguir un programa de vigilancia ambiental es el de la **protección de la salud pública** frente a la exposición a ARB y ARG a través del MA. En este sentido, la epidemiología de aguas residuales ha destacado en los últimos años como un elemento fundamental para la protección de la salud pública (e.g. SARV-COV2). La interfaz entre los humanos y el MA, en concreto las aguas residuales, es un punto estratégico para monitorizar el estado de las resistencias antimicrobianas en una población. Este tipo de monitorización permitiría detectar (nuevos) patrones de resistencia y evaluar la eficacia de las intervenciones de salud pública, entre otros.

Además, la **conservación de la calidad ambiental**, si bien no está directamente relacionada con la protección de la salud pública, contribuye de manera decisiva a este propósito. Así, el agua, suelo y aire pueden incidir en el desarrollo, transmisión, propagación y amplificación de resistencias de tres maneras (Wellcome 2020): (i) como vector de transmisión de ARB a humanos y animales, (ii) como reservorio de ARG y (iii) como escenario en el que mezclas complejas de contaminantes ejercen una presión selectiva sobre ARB. Además, tanto la fauna de vida libre como la que habita en áreas urbanas o periurbanas actúa como indicador clave de la calidad ambiental de un ecosistema, facilitando la comprensión de las dinámicas de transmisión y propagación de resistencias. Por estas razones, conservar la calidad ambiental desempeña un papel importante en la lucha contra las resistencias y, en última instancia, en la protección de la salud pública.

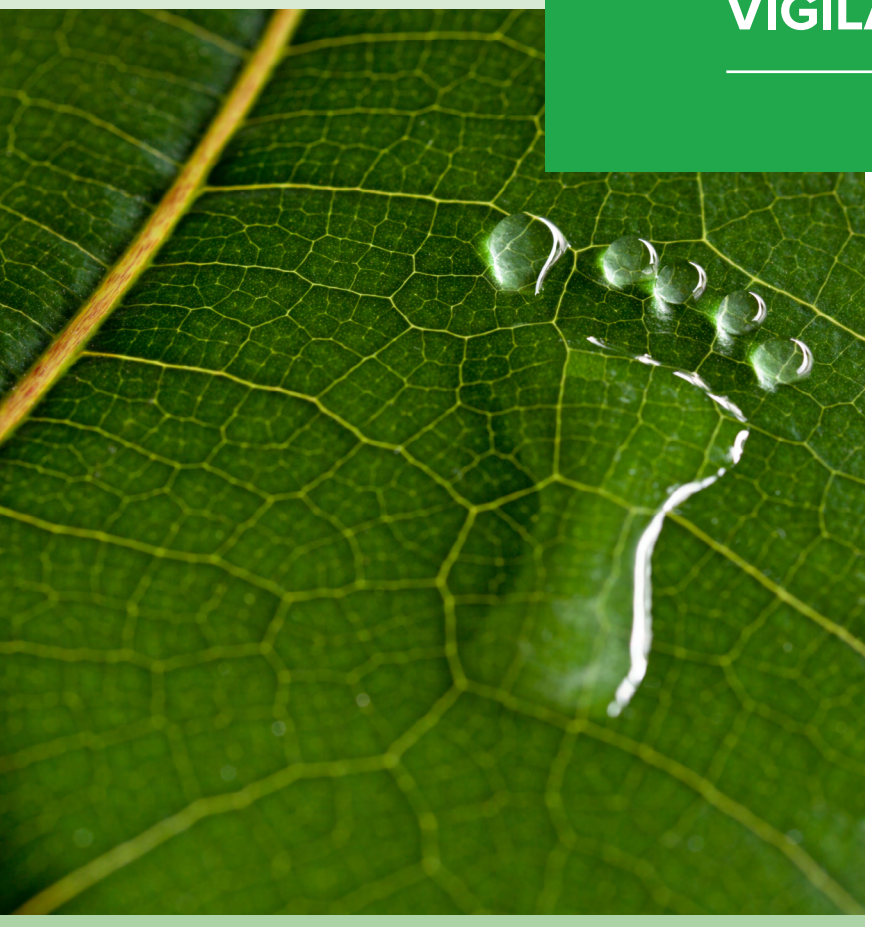
Establecidos ya los objetivos principales que puede tener un programa de vigilancia (i.e. salud pública y calidad ambiental), a continuación, enumeraremos las estrategias de vigilancia que pueden servir a estos objetivos. Cada una de las estrategias se describirá con más detalle en el capítulo 6.

- **Objetivo 1: Protección de la salud pública.**
  - Vigilancia de aguas residuales: influentes y biosólidos de EDAR.
  - Vigilancia de las aguas de uso recreacional.
  - Vigilancia de aguas regeneradas.
  - Vigilancia de aguas subterráneas.
  - Vigilancia de excretas de producción animal: zoonosis alimentarias, ocupacionales y/o ambientales.
- **Objetivo 2: Conservación de la calidad ambiental.**
  - Vigilancia de aguas residuales: influentes[1], efluentes y biosólidos de EDAR.
  - Vigilancia de suelos agrícolas.
  - Vigilancia del aire en entornos cercanos a la fuente de emisión (EDAR y granjas).
  - Vigilancia de animales de vida libre y fauna sinantrópica.

1. Para evaluar la eficiencia de la EDAR.

PRAN

6. ESTRATEGIAS DE VIGILANCIA



Aunque es ampliamente aceptado que el MA es clave en el desarrollo y la propagación de resistencias a los antibióticos , sigue siendo un desafío planificar cuándo, dónde y cómo llevar a cabo la vigilancia para monitorizar la abundancia y distribución de estas resistencias. Esto es fundamental para evaluar el riesgo potencial que estas representan para la salud humana y animal. Como se ha discutido en el capítulo anterior, los gestores han de tener claro: (1) los objetivos del programa de vigilancia, es decir, por qué se quiere vigilar y (2) las actuaciones a llevar a cabo para cumplir con los objetivos (estrategias de vigilancia).

Una vez definidos los objetivos de vigilancia, se puede seleccionar la estrategia más adecuada para alcanzarlos

A continuación, se detallan las principales estrategias de vigilancia y las técnicas de estudio más convenientes para alcanzar los objetivos fijados. Para cada estrategia de vigilancia, se hará referencia al objetivo concreto al que sirve: objetivo de salud pública (Objetivo 1) u objetivo de conservación de la calidad ambiental (Objetivo 2).

6.1. VIGILANCIA DE LOS INFLUENTES DE EDAR PARA LA PROTECCIÓN DE LA SALUD PÚBLICA

El agua residual que llega a la depuradora es, en la mayoría de los casos, una mezcla de agua residual urbana (aguas negras y grises), agua residual de origen hospitalario y, en algunos casos, también de origen industrial. Por tanto, la comunidad microbiana está formada por un gran número de microorganismos de origen fecal, incluidos patógenos de diferentes tipos —muchos de ellos ya resistentes— y otros propios de la infraestructura de los colectores (McLellan et al. 2010, McLellan *et al*., 2015; Newton *et al.* 2015). Además, hay que tener en cuenta que las aguas residuales son, por naturaleza, una muestra integrada de un gran número de habitantes (centenares, miles o, incluso, decenas de miles) y que, por tanto, representan una fuente de información valiosa sobre diferentes indicadores de salud y enfermedad sin las restricciones éticas inherentes a los estudios de biomonitoreo en humanos, el elevado coste asociado a las campañas de cribado masivo y el sesgo normalmente asociado a las encuestas individuales sobre salud (Choi et al. 2018; Daughton 2018). Estas ventajas son la base de la epidemiología de las aguas residuales (EAR) que tan buenos resultados ha dado para estimar los hábitos de consumo tanto de sustancias lícitas (café, tabaco, alcohol) como ilícitas (estupefacientes) a diferentes escalas temporales y espaciales (Mastroianni et al. 2017; González-Mariño et al. 2020).

Recientemente, las EDAR han demostrado ser muy valiosas para estimar la circulación comunitaria del virus SARS-CoV-2 y complementar la epidemiología clínica sin necesidad de recurrir a cribados masivos de la población (Farkas et al. 2020; Naughton et al. 2023; Keshaviah et al. 2023). El análisis de aguas residuales, combinado con el modelado de datos, evidencia un notable poder predictivo de la aparición y propagación de brotes antes de que se manifiesten clínicamente. Este enfoque de vigilancia ambiental no solo podría utilizar-

se para la detección temprana de brotes, sino que también resultaría más rápido, económico y completo que los métodos tradicionales de diagnóstico clínico de casos. Así, se reconoce el potencial de los modelos predictivos basados en la epidemiología de aguas residuales como una valiosa herramienta para la vigilancia y la alerta temprana (Ai et al. 2022; Hill et al. 2023; Nourbakhsh et al. 2022).

La epidemiología de aguas residuales utiliza modelos predictivos para anticipar y alertar sobre brotes de enfermedades antes de que se manifiesten clínicamente

El agua residual de entrada a la depuradora puede ofrecer también información no sesgada de la prevalencia de las resistencias a antibióticos en un barrio, ciudad o región concreta, incluyendo la de aquellos portadores asintomáticos que normalmente escapan al control clínico. Esta información no solo complementaría la vigilancia clínica de los principales patógenos resistentes en el área geográfica de interés, sino que, además, permitiría tanto la comparación con los datos clínicos existentes (prevalencia de resistencias a nivel hospitalario para los diferentes antibióticos) como la identificación de nuevas variantes genéticas de las resistencias con las que poder anticiparse a un posible brote (Hendriksen et al. 2019; Hutinel et al. 2019; Pärnänen et al. 2019; Karkman et al. 2020).

Por todo lo mencionado, el análisis por metagenómica sería el más adecuado para llevar a cabo esta vigilancia comunitaria a partir del agua residual. Este análisis, al ser no dirigido, permitiría caracterizar el resistoma y comparar su abundancia relativa entre zonas de estudio (barrios, ciudades, etc.). Como se ha indicado anteriormente, las principales desventajas de este análisis son su elevado coste, la necesidad de un equipamiento sofisticado y de conocimientos avanzados en análisis bioinformático, así como de protocolos de análisis estandarizados [ver apartado 4.2.2 Análisis moleculares no dirigidos (metagenómica)]. En todo caso, y teniendo en cuenta que la frecuencia de muestreo no tendría que ser muy alta, por ejemplo, dos veces al año, (Tabla 5), la relación coste-beneficio sería claramente favorable. Aunque las variaciones estacionales en el resistoma local parecen tener un efecto modesto sobre la variabilidad de los resultados (Munk et al. 2022), es relevante señalar que las comunidades microbianas que presentan oscilaciones sincronizadas con el ciclo solar experimentan cambios significativos en su abundancia, lo que podría influir considerablemente en este aspecto (Ai *et al.* 2022; Hill *et al*. 2023; Nourbakhsh *et al*. 2022).

Tabla 5. Esquema de vigilancia de influentes de EDAR para protección de la salud pública

Objetivo	
Protección de la salud pública	
Técnica analítica	**Indicador**
Metagenómica	Resistoma comunitario
Punto de muestreo	
Influente de EDAR	
Frecuencia de muestreo	
Dos muestras al año	

6.2. VIGILANCIA DE LOS EFLUENTES DE EDAR PARA LA CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL

En este caso, el esquema de vigilancia ambiental se puede establecer a dos niveles: (i) Evaluar la eficacia de la planta depuradora en la eliminación de ARB y ARG y (ii) cuantificar las concentraciones ARB y ARG que se vierten al medio.

6.2.1. Eficacia de la EDAR en la eliminación de ARB y ARG

Se trataría en este caso de determinar las concentraciones de una serie de indicadores (bacterias resistentes o sus genes) tanto en la entrada (influente) como en la salida (efluente) de una misma EDAR. Esto permitiría calcular las tasas de eliminación de dichos contaminantes, y evaluar la eficacia del tratamiento aplicado, ya sea entre la entrada y la salida de la planta (modelo simple), o bien entre las diferentes etapas del tren de tratamiento (entrada, tratamiento biológico aerobio, tratamiento biológico anaerobio, tratamiento terciario, efluente final). En función de la estructura de la EDAR, de si aplica o no un tratamiento terciario y de qué tipo (como radiación ultravioleta [UV], cloración, UV+cloración, humedales, entre otros), se podría evaluar la calidad del efluente tratado destinado a reutilización o vertido.

Teniendo en cuenta que el objetivo de esta aproximación es poder calcular las tasas de eliminación de los indicadores escogidos, las técnicas a utilizar tendrían que basarse en un análisis cuantitativo que permitiese determinar la abundancia absoluta por volumen de agua con suficiente sensibilidad y especificidad. Por tanto, se optaría aquí por los métodos basados en cultivo y qPCR para determinar las concentraciones de ARB y ARG, respectivamente, lo que implicaría una selección previa de las bacterias y genes a utilizar como indicadores.

En cuanto a la vigilancia ambiental de bacterias resistentes a antibióticos, recordar nuevamente que la OMS, a través de su protocolo Trycicle, recomienda el uso de *E. coli* BLEE tanto en el ámbito clínico en medicina humana y veterinaria como en el ambiental.

Con relación a los genes de resistencia, estudios recientes sugieren el uso de los genes *intI1* (integrasa de los integrones de clase 1), sul1 (resistencia a sulfonamidas), *tetA* (resistencia a tetraciclinas), $bla_{CTX\text{-}M}$ (resistencia a cefalosporinas de amplio espectro o de tercera generación) y *vanA* (resistencia a vancomicina) como indicadores generales de resistencia a antibióticos en sistemas acuáticos (Keenum et al. 2022). Otros estudios, sin embargo, proponen también los genes bla_{TEM} (resistencia a betalactámicos), *qnrS* (resistencia a fluoroquinolonas), *ermB* o *ermF* (resistencia a macrólidos), *tetA* o *tetG* (resistencia a tetraciclinas) y *aadA* (resistencia a aminoglucósidos) (Abramova et al., 2023; Manaia et al., 2023). También, puede ser importante determinar la presencia de genes de resistencia emergentes, como los de carbapenemasas ($bla_{OXA\text{-}48}$, bla_{NDM} o bla_{KPC}) o genes de resistencia a linezolid como *cfr* o *optrA* (Tabla 6).

En cuanto a la frecuencia de muestreo, sería aconsejable hacer un muestreo cada trimestre para incorporar la estacionalidad del volumen de emisión, especialmente en aquellas depuradoras cuyo caudal fluctuase mucho a lo largo del año con relación a las variaciones en la población asistida (por ejemplo, en localidades costeras que recibiesen mucho turismo en verano). Esto tendría sentido teniendo en cuenta que la eficacia de la EDAR puede depender enormemente de las diferencias entre el caudal real que recibe y el caudal para el que la EDAR ha sido diseñada.

Comparar las concentraciones de indicadores de resistencia en la entrada y en la salida de una EDAR permitiría calcular las tasas de eliminación de estos contaminantes y evaluar la eficacia del tratamiento aplicado

Tabla 6. Esquema de vigilancia de efluentes de EDAR para evaluar la eficacia de la misma en la eliminación de ARB y ARG

Objetivo	
Conservación de la calidad ambiental	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli* BLEE
qPCR	intl1 → Integrones de clase 1 *sul1* → Sulfonamidas *tetA* o *tetG* → Tetraciclinas bla_{TEM} → Betalactámicos bla_{CTX-M} → Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{KPC} → Carbapenémicos *vanA* → Vancomicina *cfr, optrA, poxtA* → Linezolid *qnrS* → Fluoroquinolonas *ermB* o *ermF* → Macrólidos *aadA* → Aminoglucósidos
Punto de muestreo	
Entrada y salida de EDAR, Dentro de la EDAR en distintos puntos del tren de tratamiento	
Frecuencia de muestreo	
4 veces al año (al menos un muestreo por estación del año)	

6.2.2. Emisión de ARB y ARG a aguas superficiales a través de efluentes de EDAR

Todo lo descrito en el apartado anterior sirve también para evaluar el impacto de los efluentes de depuración en el ecosistema receptor (normalmente un río o el mar). Si bien la importancia de la emisión depende de muchos factores, entre ellos la capacidad de dilución del sistema receptor en relación con el caudal descargado (PRAN 2023), de manera general es obvio que cuanto mayor sea el volumen de efluente descargado y la carga de ARB y ARG, mayor será la emisión al medio receptor, especialmente en una situación donde el caudal de los ríos es cada vez más bajo debido a las sequías y al aumento de temperaturas. Tanto las técnicas apuntadas en el apartado anterior, como las frecuencias de muestreo, son válidas para estimar la contribución de los efluentes de depuración a la calidad ambiental de las aguas superficiales (Tabla 7).

La vigilancia de indicadores de resistencia a la salida de la EDAR permite evaluar el impacto de los efluentes de depuración en el ecosistema receptor

Tabla 7. Esquema de vigilancia de efluentes de EDAR para evaluar el impacto sobre el medio receptor

Objetivo	
Conservación de la calidad ambiental	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli* BLEE
qPCR	intl1 → Integrones de clase 1 *sul1* → Sulfonamidas *tetA* o *tetG* → Tetraciclinas bla_{TEM} → Betalactámicos bla_{CTX-M} → Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{KPC} → Carbapenémicos *vanA* → Vancomicina *cfr, optrA, poxtA* → Linezolid *qnrS* → Fluoroquinolonas *ermB* o *ermF* → Macrólidos *aadA* → Aminoglucósidos
Punto de muestreo	
Aguas abajo del punto de vertido de la EDAR	
Frecuencia de muestreo	
Estacional (al menos un muestreo por estación del año)	

6.3. VIGILANCIA DE AGUAS REGENERADAS PARA LA PROTECCIÓN DE LA SALUD PÚBLICA

En informe del PRAN sobre fuentes de emisión y rutas de dispersión y vías de exposición ya ha sido discutida la relevancia de las aguas regeneradas como vectores de exposición a humanos al contaminar alimentos tras el riego (PRAN 2022). Sin embargo, también es preciso tener en cuenta que el uso del suelo y el cambio climático están agravando la presión sobre las aguas superficiales y subterráneas como fuentes de abastecimiento, especialmente en los países del sur de Europa (Jorda-Capdevila et al. 2019). En este contexto, la utilización de agua regenerada ya no se contempla solo como recurso para su uso ornamental (fuentes, lagunas en campos de golf, entre otras) o en agricultura, sino como una alternativa real para satisfacer las necesidades cada vez más urgentes de agua potable (Tortajada y van Rensburg 2019). A este uso planeado de las aguas regeneradas como recurso, tiene que sumarse el hecho de que, en muchos casos, parte del agua que capta la potabilizadora ya proviene de las depuradoras, puesto que aguas arriba del punto de captación el río recibe uno o varios efluentes de depuración [normalmente sin ningún tratamiento terciario previo (National Research Council 2012)]. En situaciones extremas, el agua regenerada se utiliza para aumentar el caudal del río, asegurando por una parte su caudal ecológico y, por otra, manteniendo el mínimo necesario para que la potabilizadora pueda abastecer a la población asistida (Munné et al. 2023).

Queda claro pues, que este recurso será cada vez más utilizado y que se necesita asegurar su calidad química y microbiológica teniendo en cuenta no solo los indicadores habituales, sino también aquellos que puedan derivarse del origen del agua (la depuradora) y de su tratamiento previo (radiación ultravioleta, cloración, etc.). En este contexto, el análisis de las bacterias resistentes a antibióticos y genes asociados que puedan escapar de la depuradora, aparecen como dianas analíticas clave para garantizar la calidad y seguridad del agua regenerada a utilizar. Por tanto, el análisis de las bacterias resistentes a antibióticos y sus genes tanto por cultivo como por qPCR, respectivamente, aparecen como la estrategia más adecuada (Tabla 8).

En cuanto a los puntos de muestreo, se recomienda realizar el análisis de las aguas superficiales del río antes de la descarga del efluente de la EDAR, en el efluente tras el tratamiento terciario, en el punto de captación de agua destinada a la potabilización y en el agua final después del proceso de potabilización. Este enfoque asegura una evaluación integral de la calidad del agua en cada etapa clave del proceso. La frecuencia de muestreo dependerá mucho de cada caso, necesitando de una evaluación cuidadosa en cada sistema, pero prestando especial atención tanto al volumen de agua descargada y al caudal del río, como a la estacionalidad, ya que se asume que estas prácticas serán más frecuentes en verano que en invierno.

Tabla 8. Esquema de vigilancia de aguas regeneradas

Objetivo	
Protección de la salud pública	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli* BLEE
qPCR	intI1 ➔ Integrones de clase 1 *sul1* ➔ Sulfonamidas *tetA* o *tetG* ➔ Tetraciclinas bla_{TEM} ➔ Betalactámicos $bla_{CTX\text{-}M}$ ➔ Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) $bla_{OXA\text{-}48}$, bla_{NDM}, bla_{KPC} ➔ Carbapenémicos *vanA* ➔ Vancomicina *cfr, optrA, poxtA* ➔ Linezolid *qnrS* ➔ Fluoroquinolonas *ermB* o *ermF* ➔ Macrólidos *aadA* ➔ Aminoglucósidos
Punto de muestreo	
Aguas superficiales antes del efluente de EDAR Efluente de EDAR tras tratamiento terciario Punto de captación del agua para potabilizar Agua después del proceso de potabilización	
Frecuencia de muestreo	
4 veces al año (una por estación con prioridad en verano)	

6.4. VIGILANCIA DE AGUAS SUBTERRÁNEAS Y AGUAS RECREACIONALES PARA LA PROTECCIÓN DE LA SALUD PÚBLICA

Como ya se indicó en el informe del PRAN sobre fuentes de emisión y rutas de dispersión y vías de exposición (PRAN 2022), las aguas subterráneas también se ven afectadas por las actividades humanas que se realizan en la superficie. Estas actividades son varias y tienen que ver tanto con la utilización de enmiendas agrícolas en el campo de cultivo como con la recarga de acuíferos con aguas superficiales. Ambas actividades alteran las comunidades microbianas del subsuelo, ya sea por la entrada de bacterias con fenotipos de resistencia (y sus genes asociados) que forman parte de la microbiota de la enmienda agrícola como por el agua utilizada para la recarga. Si bien se desconoce con precisión la dinámica de estos contaminantes en el nivel freático, queda cada vez más claro que depende mucho de la hidrología del acuífero en cuestión y de la frecuencia e intensidad en el uso del agua subterránea como recurso hídrico para las estaciones potabilizadoras o el riego (Boy-Roura et al. 2018). El agua subterránea debe ser analizada no solo en base a los indicadores microbiológicos habituales (*E. coli, Enterococcus spp*, esporas de *Clostridium perfringens* o colifagos somáticos, entre otros) sino también en relación con nuevos contaminantes emergentes como son de ARB y ARG. Por tanto, la vigilancia debería pasar tanto por la cuantificación de bacterias resistentes a

Tabla 9. Esquema de vigilancia de aguas subterráneas y recreacionales

Objetivo	
Protección de la salud pública	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli* BLEE
qPCR	intI1 ➔ Integrones de clase 1 *sul1* ➔ Sulfonamidas *tetA* o *tetG* ➔ Tetraciclinas bla_{TEM} ➔ Betalactámicos bla_{CTX-M} ➔ Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{KPC} ➔ Carbapenémicos *vanA* ➔ Vancomicina *cfr, optrA, poxtA* ➔ Linezolid *qnrS* ➔ Fluoroquinolonas *ermB* o *ermF* ➔ Macrólidos *aadA* ➔ Aminoglucósidos
Punto de muestreo	
Acuífero, Agua potabilizada, Agua recreacional	
Frecuencia de muestreo	
4 veces al año (una por estación). Si es posible, con mayor frecuencia entre mayo y septiembre	

antibióticos en el agua del acuífero a explotar mediante técnicas dependientes de cultivo (aquí *E. coli* BLEE aparecería como un buen indicador general), como por la monitorización por qPCR de algunos genes indicadores tanto en el acuífero como en el agua tras su potabilización (Tabla 9). Aunque en este caso es difícil proponer una frecuencia de análisis por las diferencias hidrológicas de los distintos acuíferos, se recomienda aumentar la frecuencia de muestreo en verano, ya que la explotación del acuífero se intensifica notablemente entre mayo y septiembre debido a la escasez de precipitaciones y la necesidad de disponer de agua destinada, por ejemplo, al riego de los cultivos.

Para el caso de las aguas recreacionales, la exposición a bacterias y genes de resistencia puede tener lugar a través de la ingesta de las mismas durante el uso recreativo, por lo que las técnicas analíticas y los indicadores serían los mismos que para aguas subterráneas que se usan como agua de bebida (Tabla 9).

6.5. VIGILANCIA DE BIOSÓLIDOS DE EDAR PARA LA PROTECCIÓN DE LA SALUD PÚBLICA Y LA CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL

Los lodos de depuradora (también llamados biosólidos) se generan como resultado de las distintas etapas y procesos del tratamiento de las aguas residuales en las EDAR. Según la etapa de tratamiento en la que se generan, se clasifican como primarios, secundarios (biológicos) y mixtos.

Los lodos consisten en su mayor parte de agua (>90%) y materia orgánica. Su composición es variable y depende de muchos factores, entre ellos, las características del agua residual que llega a la EDAR, los métodos de depuración empleados, el tipo y tratamiento al que es sometido el lodo o la época del año.

Debido al tratamiento en las EDAR, los lodos concentran muchas de las sustancias presentes en el agua residual, siendo un producto rico en materia orgánica y nutrientes esenciales de alto valor agronómico. Los lodos, sin embargo, son también ricos en lípidos y acumulan contaminantes hidrófobos y recalcitrantes originalmente presentes en las aguas residuales, convirtiéndolos en un sumidero tanto de una amplia gama de contaminantes, algunos de preocupación emergente (metales pesados, bifenilos policlorados, retardantes de llama bromados, fármacos (incluidos antibióticos) y productos para el cuidado personal), como de microorganismos patógenos, incluyendo ARB y ARG (McClellan y Halden 2010; Munir et al., 2011; Venkatesan y Halden 2014).

Los lodos de depuradora que se generan durante el tratamiento de aguas residuales concentran una amplia gama de sustancias contaminantes, incluyendo ARBs y ARGs

En las EDAR, los lodos se tratan para reducir su contenido en agua y contaminantes y para asegurar también la estabilidad de la materia orgánica. Los tratamientos más convencionales son la digestión anaerobia y la estabilización aerobia. Si bien en algunas EDAR (o en instalaciones externas específicas de tratamiento de residuos) los lodos se someten a tratamientos adicionales (compostaje, higienización por pasteurización) para reducir su contenido en contaminantes y aumentar su calidad, estos tratamientos convencionales no aseguran que los lodos estén libres de contaminación química y microbiológica. Esto ha impulsado el desarrollo de tratamientos alternativos para mejorar la calidad y salubridad del lodo final, como son, por ejemplo, la oxidación en agua supercrítica, pirólisis, ósmosis, proceso Fenton, tensioactivos u ozonización, entre otros. Algunos de estos tratamientos, sin embargo, tienen un alto coste energético y una eficacia variable en cuanto a la reducción de contaminantes lo que ha impedido su aplicación general.

6.5.1. Estudio epidemiológico de biosólidos de EDAR

En relación con los biosólidos de depuración es importante destacar su papel como sumideros de los contaminantes que circulan entre la población que genera ese residuo. Por ello, sería conveniente disponer de un inventario de muestras recogidas por las EDAR a lo largo del tiempo en diferentes enclaves urbanos y rurales. Esto permitiría llevar a cabo un análisis retrospectivo tanto de contaminantes químicos de preocupación emergente, como de ARB y ARG, para establecer el momento a partir del cual empezaron a circular, a fin de relacionar dicha detección con la entrada de un fármaco concreto o un antibiótico en particular en la comunidad. Además, permitiría relacionar las variaciones en la abundancia de estos marcadores químicos y biológicos en los lodos con las diferencias en los perfiles de consumo de antibióticos y la prevalencia de patógenos resistentes a los antibióticos en la comunidad de origen. El Biodesign Institute de la Universidad Estatal de Arizona dispone de un inventario de esta clase, cuyas muestras (recogidas e inventariadas en 164 EDAR a lo largo y ancho de EE.UU. desde 2001) están disponibles bajo demanda para aquellos investigadores que deseen llevar a cabo estudios retrospectivos sobre la entrada y prevalencia de contaminantes químicos y biológicos en la población estadounidense (Venkatesan et al., 2015).

Tabla 10. Esquema de vigilancia de biosólidos de depuradora para protección de la salud pública

Objetivo	
Protección de la salud pública (vigilancia epidemiológica)	
Técnica analítica	**Indicadores**
Metagenómica	Resistoma comunitario
Punto de muestreo	
Biosólidos de depuradora tras tratamiento	
Frecuencia de muestreo	
Dos muestras anuales	

6.5.2. Emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas a través de biosólidos de EDAR

En nuestro país, donde los suelos son pobres en materia orgánica, se está potenciando el uso de los lodos como fertilizante y acondicionador de suelos, lo que constituye una excelente solución como vía para el reciclaje de estos residuos. Según los datos del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, el uso agrícola de este residuo es el principal destino de los lodos resultantes de la depuración del agua residual (80% del total) (MITERD 2020a).

En este contexto, es importante remarcar que la utilización de estos lodos en agricultura puede comportar la entrada de contaminantes químicos (fármacos, plaguicidas y otros biocidas, microplásticos, aditivos industriales, cosméticos, estupefacientes) y biológicos (patógenos varios y ARB) en el suelo receptor, las aguas superficiales y el freático (Allen et al. 2010; Hölzel et al. 2010; Rahube et al. 2014; Bondarczuk, Mar-

kowicz, y Piotrowska-Seget 2016). Si bien el marco legislativo relativo a la reutilización de lodos para uso agrícola en Europa establece unos valores límite para algunos metales pesados, contaminantes orgánicos y patógenos indicadores, otros contaminantes emergentes como las bacterias resistentes a los antibióticos y sus genes de resistencia no tienen aún una regulación específica que limite su presencia en lodos. Por otra parte, el cumplimiento de esta normativa en los distintos países de la UE es heterogéneo ya que algunos países son más restrictivos que otros en cuanto a los parámetros monitorizados y a los límites impuestos. En este sentido, se espera la entrada en vigor de nuevas normativas que incluyan la monitorización de contaminantes de preocupación emergente y de ARB en los lodos de depuración que se utilicen como fertilizante en suelos agrícolas.

Tabla 11. Esquema de vigilancia de biosólidos de depuradora para evaluar la emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas

Objetivo	
Conservación de la calidad ambiental	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli* BLEE
qPCR	intl1 ➔ Integrones de clase 1 *sul1* ➔ Sulfonamidas *tetA* o *tetG* ➔ Tetraciclinas bla_{TEM} ➔ Betalactámicos $bla_{CTX\text{-}M}$ ➔ Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) $bla_{OXA\text{-}48}$, bla_{NDM}, bla_{KPC} ➔ Carbapenémicos *vanA* ➔ Vancomicina *cfr, optrA, poxtA* ➔ Linezolid *qnrS* ➔ Fluoroquinolonas *ermB* o *ermF* ➔ Macrólidos *aadA* ➔ Aminoglucósidos
Punto de muestreo	
Biosólidos antes de la aplicación al suelo	
Frecuencia de muestreo	
4 veces al año (una por estación)	

6.6. VIGILANCIA DE EXCRETAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL PARA LA PROTECCIÓN DE LA SALUD PÚBLICA Y LA CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL

En este caso, el esquema de vigilancia ambiental se establecería en dos niveles:

- Vigilancia de zoonosis alimentarias, ocupacionales y/o ambientales en excretas de producción animal (ARB).
- Vigilancia de ARB y ARG en suelos agrícolas fertilizados con excretas provenientes de ganadería.

6.6.1. Presencia de ARB con potencial zoonótico en excretas de producción animal

Desde un punto de vista de salud pública, los microorganismos provenientes de animales que deben monitorizarse serían aquellos con importancia zoonótica, incluyendo aquellas combinaciones de bacterias y genes de resistencia de importancia crítica para la salud humana, y aquellos linajes asociados a patógenos de importancia en medicina humana. Por una parte, se encontrarían aquellos que se monitorizan a nivel nacional y europeo, y que se recogen anualmente en los informes publicados por el Ministerio de Agricultura o por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (EFSA-ECDC; EFSA and ECDC 2024). Entre ellos, encontramos bacterias indicadoras, pero con potencial patogénico oportunista como *E. coli* y *Enterococcus spp*, y patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias como *Salmonella* y *Campylobacter*. Las combinaciones bacteria-antimicrobiano de importancia crítica con relevancia epidemiológica, corresponderían en el caso de *E. coli* y *Salmonella* a las resistencias a cefalosporinas de amplio espectro, fluoroquinolonas, polimixinas (colistina) y carbapenémicos, a pesar de que estos últimos no estén registrados para su uso en animales de producción (Tabla 12). Para *E. faecium* y *E. faecalis*, los antimicrobianos de mayor relevancia son los glucopéptidos (vancomicina), macrólidos, linezolid y quinupristina-dalfopristina (esta última combinación de antimicrobianos solo aplica en *E. faecium* ya que *E. faecalis* presenta resistencia intrínseca). En cuanto a *C. coli* y *C. jejuni*, las fluoroquinolonas y los macrólidos resultan de especial relevancia.

Conocer la presencia de bacterias zoonóticas en las excretas de animales de producción permite informar el riesgo de aparición de brotes en la población humana

Debido a su potencial zoonotico y capacidad de causar infecciones hospitalarias y comunitarias, *Staphylococcus aureus* es otro microorganismo para tener en cuenta, especialmente aquellas cepas resistentes a meticilina (SARM, objeto de vigilancia y notificación oficial) y/o a linezolid. En el caso de SARM, tiene interés la monitorización de linajes genéticos asociados al ganado (SARM-AG), y en especial el linaje CC398, que coloniza muy frecuentemente el ganado porcino y se transmite fácilmente a personas en contacto profesional con dicho ganado, fundamentalmente, cuando son animales vivos (Quero et al. 2023). Estos linajes pueden causar infecciones de diversa consideración. De hecho, se ha demostrado que la frecuencia de SARM-CC398 a nivel hospitalario se relaciona significativamente con la densidad de ganado porcino en las regiones en las que se encuentran dichos hospitales (Ceballos et al. 2019). También se han detectado SARM-CC398 en otros animales de producción, pero con una frecuencia inferior (Abdullahi et al. 2023). En los últimos años, están emergiendo cepas de *S. aureus* resistentes a linezolid por la presencia de genes de resistencia adquiridos (*cfr, optrA, o poxtA*), siendo de especial relevancia en el entorno del ganado porcino donde habitualmente se

detectan SARM-CC398 (Ruiz-Ripa et al. 2021). Por otro lado, destaca *Streptococcus suis*, un patógeno potencial causante de meningitis en humanos y cuyo reservorio es el ganado porcino. Aunque en nuestro país apenas se reportan casos (Díez de los Ríos et al. 2021) y estos son de origen ocupacional, se trata de un patógeno bastante común entre consumidores de productos derivados del cerdo en la región del sudeste asiático. Los antimicrobianos de elección para su tratamiento son betalactámicos y cefalosporinas.

Tabla 12. Esquema de vigilancia de excretas de producción animal para determinar la presencia de ARB con potencial zoonótico

Objetivo	
Vigilar zoonosis alimentarias, ocupacionales y/o ambientales, para la protección de la salud pública	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli BLEE* *Salmonella spp.* *E. faecium y E. faecalis* resistente a vancomicina (ERV) y linezolid (ERL) *C. coli y C. jejuni* *S. aureus* resistente a meticilina *Streptococcus suis* resistente a betalactámicos y cefalosporinas
qPCR	bla_{CTX-M} ➔ Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) *gnrS* ➔ Fluoroquinolonas: mediados por plásmidos *mcr1* ➔ Polimixinas (colistina) bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{KPC} ➔ Carbapenémicos *vanA* ➔ vancomicina *erm*(B) ➔ Macrólidos *optrA, cfr o poxtA* ➔ Linezolid *vatE* ➔ Quinupristina-dalfopristina (solo en *E. faecium*) *mecA, mecC* ➔ Meticilina (SARM). Linajes genéticos asociados al ganado (SARM-AG): CC398
Punto de muestreo	
Excretas en granjas o mataderos	
Frecuencia de muestreo	
4 veces al año (una por estación, con mayor frecuencia entre mayo y septiembre)	

6.6.2. Emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas a través de excretas de producción animal

En el caso de las emisiones al medioambiente a través de los estiércoles y purines, las especies bacterianas típicas a monitorizar, como *E. coli* y *Enterococcus spp.*, constituyen indicadores de contaminación fecal (Tabla 13). Sin embargo, en referencia a los genes de resistencia, estudios recientes basados en técnicas de secuenciación masiva ponen de manifiesto la diferencia entre las distintas especies zootécnicas en términos de abundancia relativa y diversidad de estos genes (Munk et al. 2018).

Según este estudio, mientras que la abundancia relativa de genes de resistencia es mayor en porcino que en avicultura, la diversidad de genes de resistencia parece superior en avicultura.

Tabla 13. Esquema de vigilancia de excretas de producción animal para determinar la presencia de ARB con potencial zoonótico

Objetivo	
Evaluar la emisión de ARB y ARG a suelos agrícolas para la conservación de la calidad ambiental	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli BLEE* *E. faecium y E. faecalis* resistente a vancomicina (ERV) y linezolid (ERL)
qPCR	bla_{CTX-M} → Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) *gnrS* → Fluoroquinolonas: mediados por plásmidos *mcr1* → Polimixinas (colistina) bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{KPC} → Carbapenémicos *vanA* → vancomicina *erm*(B) → Macrólidos *optrA, cfr o poxtA* → Linezolid *vatE* → Quinupristina-dalfopristina (solo en *E. faecium*)
Punto de muestreo	
Estiércoles y purines Suelos agrícolas	
Frecuencia de muestreo	
Dos muestras anuales	

6.7. VIGILANCIA DE ANIMALES DE VIDA LIBRE Y FAUNA SINANTRÓPICA PARA LA CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL

La vigilancia de los animales de vida libre no está contemplada en los programas nacionales ni europeos. Sin embargo, la realización de programas de seguimiento de bacterias resistentes a antibióticos en estos animales tiene un interés importante desde el contexto de "Una sola salud".

El estudio comparativo sobre la presencia de bacterias indicadoras centinelas entre fauna silvestre y otros elementos ambientales facilita la comprensión de las rutas de dispersión y de las vías de exposición a ARB y ARG.

La selección de la especie animal, centinela en los programas de vigilancia, condiciona la información obtenida sobre la capacidad de emisión y dispersión de bacterias resistentes a antibióticos en los ecosistemas circundantes. Por ejemplo, en caso de seleccionar aves migratorias, se estudiarán rutas de dispersión de larga distancia entre países e, incluso, entre continentes (Martínez-Álvarez et al. 2024). Por el contrario, cuando se seleccionen aves sinantrópicas no migratorias, se estudiarán rutas de dispersión limitadas a las medias o cortas distancias. Igualmente, existe diferencia

entre la información que proporcionan aquellos animales que se alimentan en el entorno de vertederos y los que lo hacen en ambientes naturales (Martínez-Álvarez et al. 2025). Por tanto, la selección de la especie o especies animales es muy importante y se ha de realizar en función del objetivo concreto que plantee el programa de vigilancia.

En el caso de animales terrestres de vida libre, sería de interés centrarse en el estudio de muestras fecales de la bacteria indicadora *E. coli* BLEE, bacterias resistentes a carbapenémicos o colistina, y *Enterobacterias* con resistencia adquirida a vancomicina (mediada por los mecanismos vanA o vanB) o a linezolid (mediada por los genes *optrA, poxtA o cfr*; Tabla 14).

En cuanto a los animales acuáticos de vida libre, algunas especies acuáticas pueden servir como centinelas e indicadores de la salud del ecosistema, así como para la detección de genes de resistencia en medios acuáticos (Campos et al. 2022). Los bivalvos de agua dulce representan potenciales especies centinela debido a su capacidad para filtrar agua y retener partículas orgánicas e inorgánicas. Diferentes estudios han demostrado la capacidad de especies invasoras, como puede ser el mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*), para bioacumular contaminantes y patógenos en su cuerpo blando (Gu and Mitchell 2002). Además de emplear dichos bivalvos para estudios ecotoxicológicos por su capacidad de acumular compuestos químicos y farmacéuticos, el estudio por cultivo de diferentes especies bacterianas contenidas en el cuerpo blando de estos moluscos, por ejemplo, *Aeromonas spp.* y *E. coli* resistentes a antimicrobianos de importancia crítica para la salud humana, podría constituir un buen indicador de la presencia de genes de resistencia en los sistemas acuáticos (Tabla 14).

Tabla 14. Esquema de vigilancia de animales de vida libre y fauna sinantrópica

Objetivo	
Vigilar animales de vida libre y fauna sinantrópica para la conservación de la calidad ambiental	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	Terrestre: *E. coli* BLEE *y E.coli* CREC (*E. coli* productor de carbapenemasas) *Enterococcus faecalis/faecium* resistente a vancomicina (ERV) y linezolid (ERL) *S. aureus* resistente a meticilina y linezolid Acuático: *Aeromonas y E. coli* resistente betalactamicos de espectro extendido y *carbapenems*
qPCR	bla_{CTX-M} ➔ Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{KPC} ➔ Carbapenémicos *vanA* ➔ vancomicina *optrA, cfr o poxtA* ➔ Linezolid *optrA, poxtA* ➔ Linezolid *mecA, mecC* ➔ Meticilina *mcr1* ➔ Colistina
Punto de muestreo	
Nicho ecológico del sujeto de estudio	
Frecuencia de muestreo	
Dos veces al año	

6.8. VIGILANCIA DEL AIRE PARA LA CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL

Según los estudios de diseminación de ARB en el ambiente, el aire desempeña un papel relevante, sobre todo, en entornos cercanos a las fuentes de emisión como granjas (tanto en el interior como en el exterior) y EDAR (Li et al. 2018; Von Salviati et al. 2015; Zieliński et al. 2021). (Li et al. 2018; Von Salviati et al. 2015; Zieliński et al. 2021). Además, la contaminación atmosférica y los fenómenos climáticos como el aumento de temperaturas o el viento favorecen dicha diseminación.

La vigilancia de bacterias indicadoras en el aire está dirigida a aquellas que resisten la desecación, pudiendo permanecer en el ambiente aéreo durante un tiempo y, en consecuencia, diseminarse (Tabla 15). En este sentido, destacan *E. coli* y *Enterococcus spp.* como representantes del ecosistema intestinal, y *S. aureus* como representante del ecosistema nasal.

Tabla 15. Esquema de vigilancia del aire en entornos cercanos a la fuente de emisión

Objetivo	
Vigilancia del aire en entornos cercanos a las fuentes de emisión para la conservación de la calidad ambiental	
Técnica analítica	**Indicadores**
Cultivo	*E. coli* BLEE *Enterococcus faecalis/faecium* resistente a vancomicina (ERV) y linezolid (ERL) *S. aureus* resistente a meticilina
qPCR	bla_{CTX-M} ➔ Cefalosporinas de amplio espectro (BLEE) *gnrS* ➔ Fluoroquinolonas: mediados por plásmidos *mcr1* ➔ Polimixinas (colistina) bla_{OXA-48}, bla_{NDM}, bla_{KPC} ➔ Carbapenémicos *vanA* ➔ vancomicina *optrA, cfr o poxtA* ➔ Linezolid *erm*(B) ➔ Macrólidos *optrA, poxtA* ➔ Linezolid *mecA, mecC* ➔ Meticilina (SARM) - Linajes genéticos asociados al ganado (SARM-AG): CC398.
Punto de muestreo	
Aire cercano a fuentes de emisión (granjas o EDAR)	
Frecuencia de muestreo	
Dos veces al año	

PRAN

7. CONCLUSIONES

La actividad investigadora sobre el papel del MA en la aparición y diseminación de las resistencias ha aumentado en los últimos años y sus resultados despiertan cada vez más interés. No obstante, hay cuestiones que aún necesitan más atención, como, por ejemplo, la determinación de los indicadores y de los valores de referencia para considerar un ambiente contaminado o aceptable, o el consenso científico y regulador para evaluar el riesgo sanitario por exposición ambiental. La investigación básica en este ámbito es fundamental para seguir avanzando, siendo necesario dotarla con recursos suficientes que sustenten programas continuos y sistemáticos de vigilancia ambiental de resistencias antimicrobianas, y resulten significativos para la salud pública.

Los esfuerzos futuros deben enfocarse en definir indicadores y valores de referencia que faciliten la evaluación del riesgo sanitario por exposición ambiental, de manera coordinada y consensuada, mediante el intercambio de información entre los sectores del enfoque Una sola salud

Gracias a la investigación, hoy en día, se cuenta con tecnología aplicable a la vigilancia de las resistencias en el ámbito medioambiental. Estos avances tecnológicos, a su vez, proporcionan soluciones prácticas y guían la toma de decisiones de las principales agencias que respaldan el enfoque "Una sola salud" en la Unión Europea. En este contexto, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) además de investigar y autorizar nuevos medicamentos antimicrobianos, supervisa la venta de antimicrobianos en animales de producción, y recoge los datos de consumo reportados a través del sistema ESUAvet. A su vez, la EFSA recoge los datos de presencia de resistencias antimicrobianas en animales de granja y en alimentos relacionados a fin de evaluar los riesgos relacionados, y el ECDC realiza tareas de coordinación de la vigilancia epidemiológica de las infecciones causadas por microorganismos resistentes, además de asesorar en el control de aquellas infecciones resistentes al tratamiento relacionadas con la atención sanitaria.

Por tanto, la vigilancia ambiental de las resistencias despierta un enorme interés, tanto en lo académico, como en la gestión de los sistemas de salud pública al constituir una fuente de información y un instrumento de apoyo en la toma de decisiones. Uno de los grandes retos actuales de la vigilancia de resistencias antibióticas, tanto en España como a nivel internacional, es la integración de los diferentes programas de vigilancia en salud humana, animal y ambiental. Para ello, el intercambio de información entre sectores debe ser fluido, tridireccional y ágil, buscando facilitar la cooperación entre diferentes ámbitos de competencia y experiencia.

Desde el PRAN se ha preparado este informe como respuesta a la preocupación local, estatal y europea sobre el papel del MA en la aparición y diseminación de las resistencias antimicrobianas. Con ese objetivo, se sugieren estrategias de vigilancia que incluyen recomendaciones sobre la metodología, los puntos de muestreo y las dianas analíticas más apropiadas dependiendo del objetivo busca-

do. Cabe señalar que, aunque las estrategias propuestas en este informe están diseñadas para ser efectivas dentro de un marco de recursos limitados, las mejores prácticas científicas sugieren que, una combinación de métodos de cultivos tradicionales con otros cultivos independientes (qPCR y metagenómica), así como aumentar la frecuencia de los muestreos (al menos dos al año, si no cuatro) con el objetivo de capturar la variabilidad estacional en las muestras, ofrecería una evaluación más completa y precisa. Sin embargo, esto requiere de una inversión significativa que no siempre es posible dentro de los márgenes económicos actuales.

A su vez, si bien se hace una descripción de los principales objetivos que deben perseguirse, y de las posibles estrategias de vigilancia para conseguirlos, los detalles específicos del protocolo de toma de muestras (i.e. cómo tomar la muestra, punto especifico de muestreo, cómo conservarlas) o los materiales y métodos necesarios para el desarrollo de cada técnica analítica no están incluidos. Dicha información forma parte del desarrollo de proyecto del plan de vigilancia que se quiera seguir y está fuera del objetivo de este informe. No obstante, proyectos europeos como EU-WISH, entre otros, pretenden dar respuesta a estos detalles, a fin de armonizar en la medida de lo posible las estrategias de vigilancia ambiental.

Así, el PRAN ofrece esta información científica y práctica que puede ser utilizada por investigadores, gestores y/o políticos como base para poner en marcha programas que avancen en la vigilancia de resistencias en el MA y, por tanto, contribuyan a la lucha frente a la resistencia antimicrobiana.

PRAN

8. ANEXO I. EPIDEMIOLOGÍA DE AGUAS RESIDUALES DE SARS-COV-2 Y LA MONITORIZACIÓN DE RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS

Anexo I. Epidemiología de aguas residuales de SARS-CoV-2 y la monitorización de resistencias a los antibióticos

Una de las consecuencias de la pandemia de la COVID-19 ha sido el renovado interés por el uso de la epidemiología de las aguas residuales como herramienta para la vigilancia de la circulación comunitaria del SARS-CoV-2 (Farkas et al., 2020; Medema et al., 2020). De hecho, muchos países y regiones, España entre ellos, han implementado programas de vigilancia de este tipo para complementar la vigilancia epidemiológica clínica y estimar la circulación del SARS-CoV-2 entre la población a partir de la detección y cuantificación del ARN del virus en el agua residual (Hillary et al. 2021; Guerrero-Latorre et al. 2022; van Boven et al. 2023). Si bien esta estrategia tiene limitaciones, también cuenta con muchas ventajas, como son: i) evita la necesidad de un cribado masivo de la población ya que la muestra de agua residual representa un gran número de individuos (de pocas decenas a centenares de miles en función del área asistida), ii) ofrece una buena correlación entre la concentración del ARN viral en el agua residual y los casos clínicos de la COVID-19 informados, iii) incluye tanto a los individuos sintomáticos como a los asintomáticos y iv) en determinadas situaciones, puede anticipar un brote de casos en un área concreta ya que la excreción del virus por las heces precede al desarrollo de síntomas clínicos (lo que se conoce como “alerta temprana”). Además, de un tiempo a esta parte, la gran mayoría de estos programas de vigilancia incluyen el monitoreo de las distintas variantes del SARS-CoV-2 para identificar rápidamente su entrada y posterior diseminación en el territorio.

Por todo ello, las autoridades sanitarias y, más concretamente, la Comisión Europea, a través de recomendaciones dirigidas a los países miembros en marzo de 2021 para la implementación de programas de vigilancia en aguas residuales complementarios a la vigilancia clínica, han reconocido la monitorización de las aguas residuales como una herramienta clave en la mejora de los planes de gestión de la pandemia de la COVID-19 (vanBoven et al. 2023; Comisión Europea 2021) (van Boven et al. 2023; Comisión Europea 2021). Este documento de recomendaciones propuso, por primera vez, la utilización de los programas de vigilancia en aguas residuales para monitorizar de forma sistemática otros patógenos de interés que puedan dar lugar a graves problemas de salud pública (virus de la polio y la gripe, otros coronavirus con potencial pandémico y bacterias resistentes a los antibióticos). Meses después, en mayo de 2020, el grupo de ministros de Salud del G7 publicó un comunicado de prensa en el que se incidía de nuevo en esta propuesta y se recomendaba utilizar de manera sistemática y global la epidemiología de las aguas residuales para mejorar la preparación sanitaria ante el riesgo de una nueva pandemia. De nuevo, las bacterias resistentes a los antibióticos estaban entre las dianas a monitorizar.

La Comisión Europea ha reconocido la monitorización de las aguas residuales como una herramienta clave en la mejora de los planes de gestión de la pandemia de la COVID-19

Por tanto, la reconversión de estos programas de vigilancia basados en la epidemiología de las aguas residuales para monitorizar de forma sistemática otros patógenos microbianos de

interés más allá del SARS-CoV-2 permitiría aprovechar una infraestructura ya disponible y coordinada (depuradoras, laboratorios analíticos, plataformas de análisis y visualización de los datos) con la experiencia acumulada no sólo durante los años de pandemia, sino también durante la carrera profesional de los expertos implicados.

En nuestro país se han llevado a cabo numerosos programas de vigilancia de SARS-CoV-2 en aguas residuales tanto a nivel estatal como autonómico. En el ámbito estatal, se encuentra el proyecto VATar impulsado por el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico junto al Ministerio de Sanidad (MITERD 2020b) que, entre mayo de 2020 y febrero de 2023, analizó semanalmente depuradoras repartidas por toda España para detectar la presencia del material genético del virus y sus variantes. A nivel autonómico cabe citar las siguientes iniciativas, entre otras:

- el Sistema VIGÍA de la Comunidad de Madrid (que desde febrero de 2021 consta de 15 .000 km de red de alcantarillado con 289 puntos de toma de muestras;
- el programa SARSAIGUA en Cataluña que, desde julio de 2020 hasta diciembre de 2023, analizó semanalmente 56 depuradoras catalanas;
- la Red Andaluza de Vigilancia de Aguas Residuales (RAVAR) a la que se han adherido todas las capitales de provincia y sus áreas metropolitanas, además de muchos otros municipios;
- el proyecto URBEHA en el País Vasco, con 4 EDAR asociadas a las principales aglomeraciones provinc iales y 6 puntos de la red de saneamiento de Vizcaya;
- el proyecto COVIDBENS en Galicia con una cobertura de un área metropolitana de aproximadamente 400.000 y 4 municipios;
- la plataforma de Alerta Temprana Aguas Residuales Castilla y León (ATARCYL YL), que ha permitido conocer la circulación del virus en los municipios de población superior a 10.000 habitantes;
- el proyecto COV-RED en Asturias;
- y un sistema de vigilancia con 12 depuradoras en Aragón.

La magnitud de dichos esfuerzos previos le ha permitido al Ministerio de Sanidad crear la Herramienta Basada en el control de las Aguas Residuales (HEBAR), la cual se constituye como un sistema de información nacional para la vigilancia ambiental de las aguas residuales. Esta herramienta permitirá la ampliación de los programas de análisis de SARS-Cov-2 a otros patógenos y contaminantes, incluyendo las bacterias resistentes a antibióticos y los residuos antibióticos. Aunque se espera que su implementación resulte relativamente sencilla y altamente costo – efectiva, su adecuación requerirá de un consenso claro en relación con los objetivos propuestos ya que, en función de estos, variarán significativamente la estrategia de muestreo, las dianas a analizar y la información resultante.

9. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abdullahi, Idris Nasir, Carmen Lozano, Andre Becker Simoes Saidenberg, Javier Latorre-Fernández, Myriam Zarazaga, and Carmen Torres. 2023. "Comparative Review of the Nasal Carriage and Genetic Characteristics of Staphylococcus Aureus in Healthy Livestock: Insight into Zoonotic and Anthroponotic Clones." Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 109:105408:1–12. https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2023.105408.
- Abramova, Anna, Thomas U. Berendonk, and Johan Bengtsson-Palme. 2023. "A Global Baseline for QPCR-Determined Antimicrobial Resistance Gene Prevalence across Environments." Environment International 178:108084. https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2023.108084.
- Ai, Yuehan, Fan He, Emma Lancaster, and Jiyoung Lee. 2022. "Application of Machine Learning for Multi-Community COVID-19 Outbreak Predictions with Wastewater Surveillance." PLOS ONE 17 (11): e0277154. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0277154.
- Allen, Heather K., Justin Donato, Helena Huimi Wang, Karen A. Cloud-Hansen, Julian Davies, and Jo Handelsman. 2010. "Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments." Nature Reviews Microbiology 2010 8:4 8 (4): 251–59. https://doi.org/10.1038/nrmicro2312.
- Bondarczuk, Kinga, Anna Markowicz, and Zofia Piotrowska-Seget. 2016. "The Urgent Need for Risk Assessment on the Antibiotic Resistance Spread via Sewage Sludge Land Application." Environment International 87:49–55. https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.11.011.
- Boven, Michiel van, Wouter A. Hetebrij, Arno Swart, Erwin Nagelkerke, Rudolf F.H.J. van der Beek, Sjors Stouten, Rudolf T. Hoogeveen, et al. 2023. "Patterns of SARS-CoV-2 Circulation Revealed by a Nationwide Sewage Surveillance Programme, the Netherlands, August 2020 to February 2022." Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin 28 (25). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.25.2200700.
- Boy-Roura, M., J. Mas-Pla, M. Petrovic, M. Gros, D. Soler, D. Brusi, and A. Menció. 2018. "Towards the Understanding of Antibiotic Occurrence and Transport in Groundwater: Findings from the Baix Fluvià Alluvial Aquifer (NE Catalonia, Spain)." Science of The Total Environment 612 (January):1387–1406. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.012.
- Campos, M., L. Lobato-Bailón, R. Merciai, O. Cabezón, I. Torres-Blas, R. Araujo, and L. Migura-Garcia. 2022. "Clearance and Persistence of Escherichia Coli in the Freshwater Mussel Unio Mancus." Scientific Reports 2022 12:1 12 (1): 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-022-16491-x.
- Ceballos, Sara, Carmen Aspiroz, Laura Ruiz-Ripa, Esteban Reynaga, José Manuel Azcona-Gutiérrez, Antonio Rezusta, Cristina Seral, et al. 2019. "Epidemiology of MRSA CC398 in Hospitals Located in Spanish Regions with Different Pig-Farming Densities: A Multicentre Study." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 74 (8): 2157–61. https://doi.org/10.1093/JAC/DKZ180.

- Choi, Phil M., Ben J. Tscharke, Erica Donner, Jake W. O'Brien, Sharon C. Grant, Sarit L. Kaserzon, Rachel Mackie, et al. 2018. "Wastewater-Based Epidemiology Biomarkers: Past, Present and Future." TrAC Trends in Analytical Chemistry 105 (August):453–69. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.06.004.
- Comisión Europea. 2021. RECOMENDACIÓN (UE) 2021/472 DE LA COMISIÓN de 17 de marzo de 2021 Sobre Un Enfoque Común Para Establecer Una Vigilancia Sistemática Del SARS-CoV-2 y Sus Variantes En Las Aguas Residuales de La UE. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32021H0472.
- Daughton, Christian G. 2018. "Monitoring Wastewater for Assessing Community Health: Sewage Chemical-Information Mining (SCIM)." Science of The Total Environment 619–620 (April):748–64. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.11.102.
- Davis, Benjamin C., Connor Brown, Suraj Gupta, Jeannette Calarco, Krista Liguori, Erin Milligan, Valerie J. Harwood, Amy Pruden, and Ishi Keenum. 2023. "Recommendations for the Use of Metagenomics for Routine Monitoring of Antibiotic Resistance in Wastewater and Impacted Aquatic Environments." Critical Reviews in Environmental Science and Technology 53 (19): 1731–56. https://doi.org/10.1080/10643389.2023.2181620.
- Díez de los Ríos, Javier, Esteban Reynaga, Merce García-Gonzàlez, Jordi Càmara, Carmen Ardanuy, Jordi Cuquet, Maria D. Quesada, et al. 2021. "Clinical and Epidemiological Characteristics of Streptococcus suis Infections in Catalonia, Spain." Frontiers in Medicine 8:8:792233. https://doi.org/10.3389/FMED.2021.792233.
- Directiva (UE) 2024/3019 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de noviembre de 2024 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (versión refundida). OJ L 3019, 12.12.2024, p. 1-59.
- EC, 2017. COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN PARLIAMENT – A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). COM(2017) 339 final. https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf.
- EC, 2019. COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL AND THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE: European Union Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment. COM(2019) 128 final.
- EFSA and ECDC. 2024. "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2021–2022." EFSA Journal 22 (2). https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2024.8583.
- Farkas, Kata, Luke S. Hillary, Shelagh K. Malham, James E. McDonald, and David L. Jones. 2020. "Wastewater and Public Health: The Potential of Wastewater Surveillance for Monitoring COVID-19." Current Opinion in Environmental Science & Health 17:14–20. https://doi.org/10.1016/J.COESH.2020.06.001.
- González-Mariño, Iria, Jose Antonio Baz-Lomba, Nikiforos A. Alygizakis, Maria Jesús Andrés-Costa, Richard Bade, Anne Bannwarth, Leon P. Barron, et al. 2020. "Spatio-Temporal Assessment of Illicit Drug Use at Large Scale: Evidence from 7 Years of International Wastewater Monitoring." Addiction (Abingdon, England) 115 (1): 109–20. https://doi.org/10.1111/ADD.14767.

- Gu, Ji Dong, and Ralph Mitchell. 2002. “Indigenous Microflora and Opportunistic Pathogens of the Freshwater Zebra Mussel, Dreissena polymorpha.” Hydrobiologia 474 (1): 81–90. https://doi.org/10.1023/A:1016517107473/METRICS.
- Guerrero-Latorre, Laura, Neus Collado, Nerea Abasolo, Gabriel Anzaldi, Sílvia Bofill-Mas, Albert Bosch, Lluís Bosch, et al. 2022. “The Catalan Surveillance Network of SARS-CoV-2 in Sewage: Design, Implementation, and Performance.” Scientific Reports 2022 12:1 12 (1): 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-022-20957-3.
- Hendriksen, Rene S., Patrick Munk, Patrick Njage, Bram van Bunnik, Luke McNally, Oksana Lukjancenko, Timo Röder, et al. 2019. “Global Monitoring of Antimicrobial Resistance Based on Metagenomics Analyses of Urban Sewage.” Nature Communications 2019 10:1 10 (1): 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3.
- Hill, Dustin T., Mohammed A. Alazawi, E. Joe Moran, Lydia J. Bennett, Ian Bradley, Mary B. Collins, Christopher J. Gobler, et al. 2023. “Wastewater Surveillance Provides 10-Days Forecasting of COVID-19 Hospitalizations Superior to Cases and Test Positivity: A Prediction Study.” Infectious Disease Modelling 8 (4): 1138–50. https://doi.org/10.1016/J.IDM.2023.10.004.
- Hillary, Luke S., Kata Farkas, Kathryn H. Maher, Anita Lucaci, Jamie Thorpe, Marco A. Distaso, William H. Gaze, et al. 2021. “Monitoring SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater to Evaluate the Success of Lockdown Measures for Controlling COVID-19 in the UK.” Water Research 15:200:117214. https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.117214.
- Hölzel, Christina S., Karin Schwaiger, Katrin Harms, Helmut Küchenhoff, Anne Kunz, Karsten Meyer, Christa Müller, and Johann Bauer. 2010. “Sewage Sludge and Liquid Pig Manure as Possible Sources of Antibiotic Resistant Bacteria.” Environmental Research 110 (4): 318–26. https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2010.02.009.
- Hutinel, Marion, Patricia Maria Catharina Huijbers, Jerker Fick, Christina Åhrén, Dan Göran Joakim Larsson, and Carl Fredrik Flach. 2019. “Population-Level Surveillance of Antibiotic Resistance in Escherichia coli through Sewage Analysis.” Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin 24:37:1800497. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800497.
- Ishii, Satoshi. 2020. “Quantification of Antibiotic Resistance Genes for Environmental Monitoring: Current Methods and Future Directions.” Current Opinion in Environmental Science & Health 16:47–53. https://doi.org/10.1016/J.COESH.2020.02.004.
- Jorda-Capdevila, Dídac, David Gampe, Verena Huber García, Ralf Ludwig, Sergi Sabater, Laura Vergoñós, and Vicenç Acuña. 2019. “Impact and Mitigation of Global Change on Freshwater-Related Ecosystem Services in Southern Europe.” Science of The Total Environment 651:895–908. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.228.
- Karkman, Antti, Fanny Berglund, Carl Fredrik Flach, Erik Kristiansson, and D. G.Joakim Larsson. 2020. “Predicting Clinical Resistance Prevalence Using Sewage Metagenomic Data.” Communications Biology 2020 3:1 3 (1): 1–10. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01439-6.
- Keenum, Ishi, Krista Liguori, Jeanette Calarco, Benjamin C. Davis, Erin Milligan, Valerie J. Harwood, and Amy Pruden. 2022. “A Framework for Standardized QPCR-Targets and Protocols for Quantifying Antibiotic Resistance in Surface Water, Recycled Water and Wastewater.” Critical Reviews in Environmental Science and Technology 52 (24): 4395–4419. https://doi.org/10.1080/10643389.2021.2024739.

- Keshaviah, Aparna, Megan B. Diamond, Matthew J. Wade, Samuel V. Scarpino, Warish Ahmed, Fabian Amman, Olusola Aruna, et al. 2023. “Wastewater Monitoring Can Anchor Global Disease Surveillance Systems.” The Lancet Global Health 11:6:e976–81. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00170-5.
- Lamas, Alexandre, Carlos Manuel Franco, Patricia Regal, José Manuel Miranda, Beatriz Vázquez, Alberto Cepeda, Alexandre Lamas, et al. 2016. “High-Throughput Platforms in Real-Time PCR and Applications.” Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications. In Tech. https://doi.org/10.5772/65760.
- Lanza, Val F., Fernando Baquero, José Luís Martínez, Ricardo Ramos-Ruíz, Bruno González-Zorn, Antoine Andremont, Antonio Sánchez-Valenzuela, et al. 2018. “In-Depth Resistome Analysis by Targeted Metagenomics.” Microbiome 6:1: 1–14. https://doi.org/10.1186/S40168-017-0387-Y/FIGURES/9.
- Li, Jing, Junji Cao, Yong Guan Zhu, Qing Lin Chen, Fangxia Shen, Yan Wu, Siyu Xu, et al. 2018. “Global Survey of Antibiotic Resistance Genes in Air.” Environmental Science & Technology 52:19: 10975–84. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.8B02204.
- Liguori K., Keenum I., Davis B., Milligan E., Heath L.S., and Pruden A. 2023. “The Water Research Foundation. Standardizing Methods with QA/QC Standards for Investigating the Occurrence and Removal of Antibiotic Resistant Bacteria/Antibiotic Resistance Genes (ARB/ARGs) in Surface Water, Wastewater, and Recycled Water. The Water Research Foundation.” https://www.waterrf.org/research/projects/standardizing-methods-qaqc-standards-investigating-occurrence-and-removal
- Liguori, Krista, Ishi Keenum, Benjamin C. Davis, Jeanette Calarco, Erin Milligan, Valerie J. Harwood, and Amy Pruden. 2022. “Antimicrobial Resistance Monitoring of Water Environments: A Framework for Standardized Methods and Quality Control.” Environmental Science & Technology 56:13: 9149–60. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.1C08918.
- Manaia, Célia M. 2017. “Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk.” Trends in Microbiology 25:3: 173–81. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.11.014.
- Manaia, Célia M, C Elia, M Manaia, Chang-Ping Yu, and Scott Bradford. 2023. “Framework for Establishing Regulatory Guidelines to Control Antibiotic Resistance in Treated Effluents.” Critical Reviews in Environmental Science and Technology 53:6: 754–79. https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2085956.
- Martínez-Álvarez, Sandra, Pierre Châtre, Teresa Cardona-Cabrera, Pauline François, Alberto Sánchez-Cano, Ursula Höfle, Myriam Zarazaga, Jean Yves Madec, Marisa Haenni, and Carmen Torres. 2023. “Detection and Genetic Characterization of BlaESBL-Carrying Plasmids of Cloacal Escherichia coli Isolates from White Stork Nestlings (Ciconia ciconia) in Spain.” Journal of Global Antimicrobial Resistance 34:186–94. https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2023.07.011.
- Martínez-Álvarez, Sandra, Pierre Châtre, Pauline François, Myriam Zarazaga, Jean-Yves Madec, Marisa Haenni, and Carmen Torres. 2025. “Comparative Phylogenomics of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Revealed a Wide Diversity of Clones and Plasmids in Spanish Chicken Meat.” International Journal of Food Microbiology 426:110900. https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2024.110900.

- Mastroianni, Nicola, Ester López-García, Cristina Postigo, Damià Barceló, and Miren López de Alda. 2017. "Five-Year Monitoring of 19 Illicit and Legal Substances of Abuse at the Inlet of a Wastewater Treatment Plant in Barcelona (NE Spain) and Estimation of Drug Consumption Patterns and Trends." Science of The Total Environment 609:916–26. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.126.
- McClellan, Kristin, and Rolf U. Halden. 2010. "Pharmaceuticals and Personal Care Products in Archived U.S. Biosolids from the 2001 EPA National Sewage Sludge Survey." Water Research 44:2: 658–68. https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.12.032.
- McLellan, S. L., S. M. Huse, S. R. Mueller-Spitz, E. N. Andreishcheva, and M. L. Sogin. 2010. "Diversity and Population Structure of Sewage Derived Microorganisms in Wastewater Treatment Plant Influent." Environmental Microbiology 12:2: 378. https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2009.02075.X.
- McLellan, Sandra L., Jenny C. Fisher, and Ryan J. Newton. 2015. "The Microbiome of Urban Waters." International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology 18:3: 141. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.244.
- Medema, Gertjan, Leo Heijnen, Goffe Elsinga, Ronald Italiaander, and Anke Brouwer. 2020. "Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands." Environmental Science & Technology Letters 7:7: 511–16. https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.0C00357.
- MITERD. 2020a. "Ministerio Para La Transición Ecológica y El Reto Demográfico. Informe 2018 Sobre El Estado Del Patrimonio Natural y de La Biodiversidad En España." https://doi.org/NIPO:638-19-089-5.
- MITERD, 2020b. "Ministerio Para La Transición Ecológica y El Reto Demográfico. Vigilancia Microbiológica En Aguas Residuales y Aguas de Baño Como Indicador Epidemiológico Para Un Sistema de Alerta Temprana Para La Detección Precoz de SARS-CoV-2 En España." https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/concesiones-y-autorizaciones/vertidos-de-aguas-residuales/alerta-temprana-covid19.html.
- Munir, Mariya, Kelvin Wong, and Irene Xagoraraki. 2011. "Release of AntibioticResistant Bacteria and Genes in the Effluent and Biosolids of Five Wastewater Utilities in Michigan." Water Research 4:2: 681–93. https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.033.
- Munk, Patrick, Christian Brinch, Frederik Duus Møller, Thomas N. Petersen, Rene S. Hendriksen, Anne Mette Seyfarth, Jette S. Kjeldgaard, et al. 2022. "Genomic Analysis of Sewage from 101 Countries Reveals Global Landscape of Antimicrobial Resistance." Nature Communications 13 (1). https://doi.org/10.1038/S41467-022-34312-7.
- Munk, Patrick, Berith Elkær Knudsen, Oksana Lukjacenko, Ana Sofia Ribeiro Duarte, Liese Van Gompel, Roosmarijn E.C. Luiken, Lidwien A.M. Smit, et al. 2018. "Abundance and Diversity of the Faecal Resistome in Slaughter Pigs and Broilers in Nine European Countries." Nature Microbiology 2018 3:8: 898–908. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9.
- Munné, Antoni, Carolina Solà, Elisabet Ejarque, Josep Sanchís, Pere Serra, Irene Corbella, Mercè Aceves, et al. 2023. "Indirect Potable Water Reuse to Face Drought Events in Barcelona City. Setting a Monitoring Procedure to Protect Aquatic Ecosystems and to Ensure a Safe Drinking Water Supply." Science of The Total Environment 866:161339. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.161339.

- National Research Council. 2012. Water Reuse: Potential for Expanding the Nation's Water Supply Through Reuse of Municipal Wastewater. Washington, DC: The National Academies Press. https://doi.org/https://doi.org/10.17226/13303.
- Naughton, Colleen C., Fernando A. Roman, Ana Grace F. Alvarado, Arianna Q. Tariqi, Matthew A. Deeming, Krystin F. Kadonsky, Kyle Bibby, et al. 2023. "Show Us the Data: Global COVID-19 Wastewater Monitoring Efforts, Equity, and Gaps." FEMS Microbes 4 :1–8. https://doi.org/10.1093/FEMSMC/XTAD003.
- Newton, Ryan J., S.L. McLellan, Deborah K. Dila, Joseph H. Vineis, Hilary G. Morrison, A. Murat Eren, and Mitchell L. Sogin. 2015. "Sewage Reflects the Microbiomes of Human Populations." mBio 6:2. https://doi.org/10.1128/MBIO.02574-14.
- Nourbakhsh, Shokoofeh, Aamir Fazil, Michael Li, Chand S. Mangat, Shelley W. Peterson, Jade Daigle, Stacie Langner, et al. 2022. "A Wastewater-Based Epidemic Model for SARS-CoV-2 with Application to Three Canadian Cities." Epidemics 39:100560. https://doi.org/10.1016/J.EPIDEM.2022.100560.
- Pärnänen, Katariina M.M., Carlos Narciso-Da-Rocha, David Kneis, Thomas U. Berendonk, Damiano Cacace, Thi Thuy Do, Christian Elpers, et al. 2019. "Antibiotic Resistance in European Wastewater Treatment Plants Mirrors the Pattern of Clinical Antibiotic Resistance Prevalence." Science Advances 5:3. https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAU9124/SUPPL_FILE/AAU9124_SM.PDF.
- PRAN, 2022. "Plan Nacional Frente a La Resistencia a Los Antibióticos. INFORME 1.1: Estudio de Las Principales Fuentes de Emisión, Rutas de Dispersión y Vias de Exposición a Los Antimicrobianos, Bacterias Resistentes y Genes de Resistencia Antimicrobiana Para Personas y Animales. Estudio de Las Principales Fuentes de Emisión, Rutas de Dispersión y Vías de Exposición a Los Antimicrobianos, Bacterias Resistentes y Genes de Resistencia Antimicrobiana Para Personas y Animales." https://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-medioambiente-fuentes-de-emision.
- PRAN, 2023. "Plan Nacional Frente a La Resistencia a Los Antibióticos. Informe 2.2. Residuos de Antibióticos En Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales y Aguas Superficiales." Https://Www.Resistenciaantibioticos.Es/Es/Publicaciones/Informe-22-Residuos-de-Antibioticos-En-Estaciones-Depuradoras-de-Aguas-Residuales.
- Quero, Sara, Marina Serras-Pujol, Noemí Párraga-Niño, Carmen Torres, Marian Navarro, Anna Vilamala, Emma Puigoriol, et al. 2023. "Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus in Pork Industry Workers, Catalonia, Spain." One Health 16:100538. https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2023.100538.
- Rahube, Teddie O., Romain Marti, Andrew Scott, Yuan Ching Tien, Roger Murray, Lyne Sabourin, Yun Zhang, Peter Duenk, David R. Lapen, and Edward Topp. 2014. "Impact of Fertilizing with Raw or Anaerobically Digested Sewage Sludge on the Abundance of Antibiotic-Resistant Coliforms, Antibiotic Resistance Genes, and Pathogenic Bacteria in Soil and on Vegetables at Harvest." Applied and Environmental Microbiology 80:22: 6898–6907. https://doi.org/10.1128/AEM.02389-14.
- Roux, Kenneth H. 2009. "Optimization and Troubleshooting in PCR." Cold Spring Harbor Protocols 4. https://doi.org/10.1101/PDB.IP66.

- Ruiz-Ripa, L., A. Bellés-Bellés, R. Fernández-Fernández, M. García, A. Vilaró, M. Zarazaga, and C. Torres. 2021. "Linezolid-Resistant MRSA-CC398 Carrying the Cfr Gene, and MRSA-CC9 Isolates from Pigs with Signs of Infection in Spain." Journal of Applied Microbiology 131:2: 615–22. https://doi.org/10.1111/JAM.14988.
- Salviati, Christina Von, Henriette Laube, Beatriz Guerra, Uwe Roesler, and Anika Friese. 2015. "Emission of ESBL/AmpC-Producing Escherichia Coli from Pig Fattening Farms to Surrounding Areas." Veterinary Microbiology 175:1: 77–84. https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2014.10.010.
- Sandberg, Kyle D., Satoshi Ishii, Timothy M. LaPara, Kyle D. Sandberg, Satoshi Ishii, and Timothy M. LaPara. 2018. "A Microfluidic Quantitative Polymerase Chain Reaction Method for the Simultaneous Analysis of Dozens of Antibiotic Resistance and Heavy Metal Resistance Genes." EnSTL 5:1: 20–25. https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.7B00552.
- Tortajada, Cecilia, and Pierre van Rensburg. 2019. "Drink More Recycled Wastewater." Nature 2021 577:7788:26–28. https://doi.org/10.1038/d41586-019-03913-6.
- Venkatesan, Arjun K., Hansa Y. Done, and Rolf U. Halden. 2015. "United States National Sewage Sludge Repository at Arizona State University--a New Resource and Research Tool for Environmental Scientists, Engineers, and Epidemiologists." Environmental Science and Pollution Research International 22:3: 1577–86. https://doi.org/10.1007/S11356-014-2961-1.
- Venkatesan, Arjun K., and Rolf U. Halden. 2014. "Wastewater Treatment Plants as Chemical Observatories to Forecast Ecological and Human Health Risks of Manmade Chemicals." Scientific Reports 4:1: 1–7. https://doi.org/10.1038/srep03731.
- Waseem, Hassan, Hamza Saleem Ur Rehman, Jafar Ali, Muhammad Javed Iqbal, and Muhammad Ishtiaq Ali. 2020. "Global Trends in ARGs Measured by HT-QPCR Platforms." Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment: Volume 1 in the Advances in Environmental Pollution Research Series: 206–22. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00014-0.
- Wellcome. 2020. "The Global Response to AMR: Momentum, Success, and Critical Gaps." https://wellcome.org/reports/global-response-amr-momentum-success-and-critical-gaps.
- WHO. 2021. "WHO Integrated Global Surveillance on ESBL-Producing E. coli Using a 'One Health' Approach: Implementation and Opportunities." http://apps.who.int/bookorders.
- Zieliński, Wiktor, Ewa Korzeniewska, Monika Harnisz, Justyna Drzymała, Ewa Felis, and Sylwia Bajkacz. 2021. "Wastewater Treatment Plants as a Reservoir of Integrase and Antibiotic Resistance Genes - An Epidemiological Threat to Workers and Environment." Environment International 156:106641. https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2021.106641.

Plan Nacional
Resistencia
Antibióticos

MINISTERIO
DE SANIDAD

agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios