

**EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE ANTIBIÓTICOS
SOBRE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN
CEPAS DE E. COLI DE POLLOS DE ENGORDE**

Trabajo Final de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria
(MUGSCA)

Fenollar Penadés, Alejandro

Jiménez Belenguer, Ana I. (tutora)

Doménech Antich, Eva M. (cotutora)

EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE ANTIBIÓTICOS SOBRE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE *E. COLI* DE POLLOS DE ENGORDE

Alejandro Fenollar Penadés, Ana I. Jiménez Belenguer¹, Eva M. Doménech Antich²

RESUMEN

El uso de antimicrobianos de amplio espectro propicia la selección de cepas multirresistentes difíciles de tratar. Diversos estudios han demostrado la existencia de transmisión de resistencias entre animales, alimentos y humanos, así como la transferencia de resistencias entre diferentes especies bacterianas en el intestino humano y animal. En el presente estudio se cultivaron muestras fecales de pollos de engorde a diferentes momentos del ciclo de crecimiento y se realizó el antibiograma de las cepas de *E. coli*. Se vio una elevada presencia de multirresistencias, y se demostró a nivel *in vitro* la transferencia de genes de resistencia entre *E. coli* y *Salmonella*.

L'ús d'antimicrobians d'ampli espectre afavorix la selecció de soques multirresistents difícils de tractar. Diversos estudis han demostrat l'existència de transmissió entre animals, aliments i humans, així com la transferència de resistències entre diferents espècies bacterianes al intestí humà i animals. Al present estudi es van cultivar mostres fecals de pollastres d'engreixament a diferents moments del cicle de creixement i es va fer l'antibiograma dels *E. coli*. Es va vore una elevada presència de multirresistències, i es va demostrar a nivell *in vitro* la transferència de gens de resistència entre *E. coli* i *Salmonella*.

The use of broad-spectrum antimicrobials promotes the selection of multiresistant strains difficult to treat. Several studies have demonstrated the existence of transmission between animals, food and humans, as well as the transfer of resistances between different bacterial species in the human and animal gut. In the present study faecal samples from broilers were growth at different moments to the growth cycle of the broilers and susceptibility test was performed for the *E. coli*. An highly presence of multiresistance was observed, and the transfer of resistance genes between *E. coli* and *Salmonella* was demonstrated.

Palabras clave: Multirresistencias, Elementos genéticos móviles, *Escherichia coli*, *Salmonella*, antibiograma, antimicrobiano

¹ Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València

² Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València

INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos en cualquier campo de aplicación propicia la aparición y selección de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos. En las últimas décadas se ha incrementado la preocupación del público por el uso que se hace de los antibióticos debido a la aparición y propagación de cepas resistentes que, en algunos casos, limitan la efectividad de los antibióticos para uso clínico en humanos.

El uso de los antibióticos de amplio espectro crea una presión selectiva en la microbiota, lo que crea un círculo vicioso entre el tratamiento y la aparición de nuevas bacterias resistentes (Schjørring. y Krogfelt, 2011). Las infecciones por estas bacterias resistentes, portadoras en muchos casos de b-lactamasas de amplio espectro (ESBL por sus siglas en inglés) las hace resistentes a muchos antibióticos de uso común en medicina humana, como cefalosporinas y quinolonas. Los elevados casos de resistencias a cefalosporinas de 3ª generación, hacen que el tratamiento para infecciones severas, de las que *Escherchia coli* es causante común, deba iniciarse con terapias de amplio espectro (con carbapenems...), lo que implica mayores costes y el estímulo de la expansión de cepas resistentes a carbapenems (WHO.Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. 2014).

Las bacterias resistentes pueden estar presentes en los alimentos que se consumen y si estos no se procesan adecuadamente, podrían originar una infección difícil de tratar (Verraes et al., 2013), y esto puede suponer un grave riesgo para la salud del consumidor. Los patógenos gastrointestinales pueden adquirir una posición de ventaja cuando los pacientes son tratados, por otras razones, con antibióticos. La resistencia antimicrobiana puede ir acompañada de un incremento en la virulencia que puede llevar a la coselección de propiedades de resistencia y virulencia a través de la integración de plásmidos de resistencia y virulencia (Fluit 2005 y Guerra et al., 2004).

En la década de los 90 cuando el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento (AGP por sus siglas en inglés) para ganadería era una práctica global, diferentes estudios mostraron que los animales de abasto pueden actuar como reservorios de microorganismos resistentes y que estos pueden extenderse por la población y dificultar el tratamiento de las infecciones (Aarestrup 1995, Klare et al. 1995 y Bates et al. 1994). Investigaciones llevadas a cabo en distintos países relacionan el uso de AGP y la aparición de resistencias a los antibióticos de uso común en humanos (Manson et al 2003, Wilson et al 2002, Gambarotto et al 2001, McDonald et al 2001, Aarestrup et al 2000 y Robredo et al 2000). Esto se vio en macrólidos, evermicinas, bacitracina (Aarestrup et al., 2000) y estreptograminas (Gambarotto et al., 2001, Aarestrup et al., 2000 y Robredo et al., 2000). Debido al conocimiento del papel del uso de los AGP se empezaron a hacer leyes más restrictivas en el ámbito de la ganadería y en el año 2006 se prohibió en la Unión Europea el uso de AGP y se limitó el uso de antibióticos en piensos (CE 1831/2003). Dicha prohibición ha logrado disminuir en gran medida el uso de antimicrobianos en la ganadería y con ello reducir la presión selectiva favorable a las bacterias resistentes

presentes en los animales de abasto, en los alimentos y en el hombre (Wegner 2003).

Estudios llevados a cabo con enterococos han detectado la presencia de cepas estrechamente relacionadas o idénticas en animales, humanos y alimentos, demostrando así la importancia de los alimentos en la transmisión de microorganismos resistentes (Bruinsma et al., 2002). Además se ha visto que la transmisión de bacterias resistentes desde los alimentos de origen animal al hombre ha incrementado el número de personas sanas portadoras de cepas resistentes (Wegner 2003). Así mismo, se han visto incrementadas en todas las especies de animales de abasto el número de cepas de *E. coli* portadoras de ESBLs, pero sobretodo, este incremento se ha apreciado en los pollos de engorde de cría intensiva (Bortolaia et al., 2010, Diarrassouba et al., 2007, Verloo et al., 2003 y Smet et al., 2000).

Estudios demuestran que la transferencia de genes de resistencia entre bacterias en el intestino animal y humano es posible. Cavaco et al. (2008) en un experimento con cerdos donde se aislaron cepas endógenas de *E. coli* con el gen de ESBLs *bla_{CTX-M}*, vio como al someter a un tratamiento veterinario con cefalosporinas a los cerdos aumentaba la diversidad de cepas endógenas de *E. coli* con el gen de resistencia, lo que sugiere que se da una transferencia genética horizontal (HGT por sus siglas en inglés) durante la presión selectiva ejercida por el tratamiento.

El tracto gastrointestinal humano es un reservorio importante de bacterias con capacidad tanto de recibir como de transferir genes de resistencias (Schjørring y Krogfelt 2011), por lo que es importante tener en cuenta el fenómeno de HGT como un riesgo añadido ya que si los alimentos ingeridos están contaminados con cepas bacterianas resistentes, aunque estas no sean patógenas pueden transferir las resistencias a la microbiota endógena o a cepas patógenas que pudieran estar presentes. De hecho, ya en 1974 Burton y colaboradores, demostraron mediante un estudio con voluntarios humanos que hay transferencia de genes de resistencia entre *E. coli* de origen animal y *E. coli* endógenas de los participantes durante la administración de un tratamiento con tetraciclinas. Más adelante Balis et al. (1996) en otros experimentos demostraron que la transferencia de plásmidos con resistencia a ampicilina desde *Salmonella* Enteritidis presente en los alimentos hacia *E. coli* endógenas del intestino humano era posible y mediante ensayos *in vitro* demostraron que la transferencia era posible y a elevada frecuencia. Si los alimentos están contaminados con *E. coli* productores de ESBLs y no se procesan adecuadamente, las personas pueden ingerir las cepas resistentes y podría darse la transferencia hacia cepas endógenas (Schjørring y Krogfelt 2011). Así pues, la presencia de resistencias en microorganismos comensales constituye un problema indirecto de salud pública ya que los genes de resistencia pueden ser transferidos a microorganismos patógenos, por ejemplo mediante la ingestión de cepas comensales con resistencias y que estas sean transferidas a cepas endógenas, que después podrían transferirles en el intestino humano los genes de resistencia a cepas patógenas ingeridas posteriormente. Salyers et al., (2004) propusieron que en el intestino humano la transferencia horizontal de genes entre bacterias comensales se

da con frecuencia. Si esta transferencia se da también entre bacterias no endógenas, aunque no sean patógenas, en el caso de recibir genes de virulencia o de resistencia podrían convertirse en un peligro potencial para la salud de la persona portadora.

En el informe de 2011, la European Food Safety Authority (EFSA) y la European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) publicaron los últimos resultados de los test de resistencias a antibióticos de los países de la Unión Europea. Los resultados mostraron que las resistencias eran “comúnmente encontradas” en *Salmonella*, *Campylobacter* y en *E. coli* en muestras procedentes de animales y alimentos. Las resistencias a los antibióticos más antiguos (tetraciclinas, ampicilina y sulfonamidas) fueron del 12% y del 60% en *Salmonella* desde muestras de carne y animales respectivamente. Los resultados mostraron también un elevado nivel de resistencia a ciprofloxacino en *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli*. Las resistencias fueron hasta del 22% en *Salmonella* en pollo y carne de pollo, 47% en *E. coli* desde pollos y de entre el 33% hasta el 78% en *Campylobacter* desde pollos y carne de pollo, cerdos y ganado (EFSA y ECDC, 2011)

Se ha confirmado la existencia de la transferencia de resistencias entre cepas bacterianas presentes en pollos a cepas humanas en diferentes estudios, en los que además se ha demostrado la transferencia de ESBLs desde pollos a humanos. Leverstein-van Hall et al., (2011) vio que hay presentes genes ESBL idénticos tanto en aislados humanos como de pollos y que un elevado porcentaje de cepas aisladas de pollos pertenecen al mismo genotipo que los aislados de humanos. Esto indica que hay un contacto elevado entre las poblaciones de *E. coli* humanas y las de pollos y que estas, son capaces de transferirse genes mutuamente.

Por todo lo expuesto anteriormente y debido a la importancia de la cría de pollos para consumo humano el objetivo de este estudio fue el analizar la aparición y evolución de las resistencias en una población de 22 pollos de engorde expuestos a diferentes dosis de amoxicilina (tratamiento veterinario de primera elección en pollos) por un periodo que abarca desde su nacimiento hasta su sacrificio. Con ello, se pretende evaluar la variedad de resistencias seleccionadas mediante la administración de un único antibiótico, la influencia de la vía de administración (oral o por bebedero) en la selección de cepas resistentes, las diferencias que se dan para las distintas dosis en la cantidad de resistencias seleccionadas en el tiempo y la capacidad de transferencia de las resistencias des de *E. coli* hacia *Salmonella* sensibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría de los pollos

Los pollos de 1 día de vida procedentes de incubadora comercial de la estirpe Ross se dispusieron aleatoriamente después de la recogida de los meconios en 7 corrales (un corral por grupo de dosis) de 1 x 1,3 m con un

comedero tipo tolva y 3 bebederos de tetina y la superficie del suelo cubierta con 10cm de viruta nueva de madera. La disposición fue: 4 pollos en el corral de control y 3 pollos en los 6 corrales restantes, siendo un corral por grupo y tipo de dosis de antibiótico suministrado.

Durante los 10 primeros días se instaló un foco de infrarrojos en cada corral para mantener la temperatura adecuada para el desarrollo de los pollos. Para su alimentación se usó pienso comercial (de iniciación hasta los 21 días y después pienso de crecimiento).

Los pollos se pesaron antes de la administración del antibiótico para ajustar la dosis. Se usó el antibiótico amoxicilina (tratamiento de elección veterinaria en pollos) a diferentes dosis. Se administraba durante 3 días seguidos y se dejaban a continuación 11 días hasta la siguiente administración. En la primera toma de muestra los pollos no habían recibido tratamiento antibiótico. La primera tanda de tratamiento se hizo a la semana de vida de los pollos, y luego una tanda cada dos semanas.

Los grupos fueron 3 según la cantidad de dosis: grupo control (sin dosis de antibiótico), dosis normal (24 mg de amoxicilina/kg de peso), dosis muy baja (1/3 de la dosis normal), dosis baja (2/3 de la dosis normal). Cada grupo de pollos a los que se administró dosis se subdividieron según la vía de administración (oral o por bebedero). Así, cada grupo, excepto el control, estaba conformado por dos corrales. La administración oral se realizó directamente en la boca del pollo con una jeringa y para la administración en el agua se disolvió el antibiótico en un bebedero específico usando la dosis de antibiótico en relación a la media del peso de los 3 pollos del corral.

Los pollos se sacrificaron el día 49 (día de la última toma de muestra).

Recogida de muestras fecales

Se emplearon 3 metodologías distintas. En el primer muestreo se recogieron los meconios mediante presión de la zona abdominal de los pollos de un día de vida y se recogieron en un bote para muestras estéril (no se pudo recoger una muestra de cada pollo ya que algunos ya no tenían meconios) y se mantuvo en frío hasta el procesado de las muestras. En el segundo y tercer muestreo, se usó un hisopo recolector de muestras en tubo con medio de transporte (Deltalab Collection and transport system. Amies swab ps+viscose) y se tomó la muestra directamente de la cloaca de cada pollo y se mantuvo en frío hasta el momento de su procesado. En el cuarto muestreo (último), se tomó la muestra de los ciegos recogiendo la materia fecal en botes estériles para muestras y se mantuvieron en frío hasta el momento del procesado.

Recuento de *E. coli*

El recuento de *E. coli* se hizo siguiendo la norma UNE-ISO 16649-1 "Método horizontal para la enumeración de *Escherchia coli* beta-glucuronidasa positivo". A partir de la muestra fecal de cada pollo se hicieron diluciones decimales seriadas. Se usaron 10mL de caldo nutritivo (Scharlau Nutrient Broth) o de agua de peptona tamponada (APT) (Merck Petone

Water buffered) para la dilución inicial y tubos con 9mL de agua destilada estéril para las diluciones (de una unidad logarítmica). Para la realización de la dilución inicial, en el primer muestreo se resuspendieron los meconios en los tubos de 10mL APT. Para el segundo y tercer muestreo se resuspendió el contenido adherido al escobillón en tubos con 10mL de caldo nutritivo. En el cuarto muestreo, se resuspendieron 0,1g de materia fecal de los ciegos en 10mL de caldo nutritivo.

Una vez completadas las diluciones decimales seriadas de la muestra de cada pollo, se sembraron en superficie 0,1mL por duplicado en placas de TBX (OXOID T.B.X. Medium). Las placas se dejaron incubar a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h para permitir solo el crecimiento de *E. coli*, y se realizó el recuento de las colonias de *E. coli*.

Selección de cepas de *E. coli*

En todos los muestreos realizados se seleccionaron de forma aleatoria 2 colonias de *E. coli* por pollo, a partir de las placas de TBX usadas para los recuentos. Se seleccionaron aquellas colonias típicas de *E. coli* para ese medio, colonias con bordes definidos de color verde/verde azulado, y se hace un pase en triple estría a placas de PCA (Scharlau Plate Count Agar) que se dejan incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. La confirmación bioquímica de estas colonias se realiza mediante la prueba del Indol, para ello se resuspendió una colonia aislada de las placas de PCA en 10 ml de caldo de triptófano (Merck Microbiology DEV tryptophan broth) y se deja incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Posteriormente se adicionan dos gotas de reactivo de Kovacs y se seleccionan aquellas cepas en las que aparece un anillo rojo en la superficie del tubo.

En los casos en que no se obtuvo un crecimiento en las placas de TBX sembradas para los recuentos, se volvió a sembrar en triple estría desde la dilución inicial una placa de TBX y se incubó a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h y se prosiguió según lo ya descrito para confirmar la colonia como *E. coli*. En las colonias que el indol dio negativo, se procedió al aislamiento de otra colonia sospechosa de ser *E. coli* desde la placa de TBX y se repitió el proceso.

Comprobación ausencia de *Salmonella*

La comprobación de ausencia de *Salmonella* se hizo siguiendo las indicaciones de la norma UNE-EN ISO 6579 2003 "Método de detección horizontal de *Salmonella*".

Primero se hizo el preenriquecimiento de la muestra fecal resuspendiendo la muestra en 10mL de APT. En el caso del primer muestreo, para el preenriquecimiento se usó la dilución inicial en agua de peptona usada para las diluciones seriadas para el recuento de *E. coli*. En los muestreos 2 y 3 se resuspendió parte del contenido del escobillón en un tubo con 10ml de APT que se usó como preenriquecimiento. En el muestreo 4, por su parte, se adicionó 1g de materia fecal a 10mL de APT. Una vez realizado el preenriquecimiento, se usaron los medios líquidos Rappaport-Vassiliadis (RV) (Difco Rappaport-Vassiliadis R10 Broth) y MKTTn (Scharlau

Müller-Kauffmann medium base; Panreac Iodine resublimed purissimum; Panreac Potassium Iodure purissimum y Fluka Novobiocin sodim salt) para el enriquecimiento. Para ello se transfirieron 0,1ml del preenriquecimiento a un tubo con 10mL de RV y se incubó a $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h y 1mL del preenriquecimiento a 10mL de MKTTn que se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Des de los tubos del enriquecimiento, se sembraron de cada tubo una placa de agar Hektoen (Merck Microbiology Hektoen enteric agar) y una placa de agar XLD (Scharlau Xylosa Lysine Deoxychocolate Agar) que se incubaron $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Las muestras analizadas fueron todas las disponibles en el primer muestreo, 4 muestras aleatorias pertenecientes cada una a un grupo de dosis de antibiótico diferente incluyendo el control para los muestreos segundo y tercero y finalmente en el cuarto muestreo se comprobaron todas las muestras.

Extracción del DNA de *Salmonella*

Se extrajo el DNA de las células crecidas en el caldo RV de las muestras del cuarto muestreo. La extracción se realizó a partir de un volumen inicial de muestra de 1,5mL de RV y se usó un kit comercial de extracción de DNA (Sigma GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit) siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR de *Salmonella*

Se realizaron PCR's a partir de las extracciones de DNA. Para su realización, se usaron los primers descritos por Aabo *et al* (1993) que amplifican un fragmento de 429pb de ADN cromosómico, cuya secuencia es:

ST11: 5'-GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA-3'

ST15: 5'-GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G-3'

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL (20 μL de mix y 5 μL de DNA). Se incluyeron un control negativo (se reemplazó el DNA por agua miliQ estéril) y un control positivo (se usó DNA de la cepa *Salmonella* CECT 915). La concentración de los reactivos usados para hacer el mix fue: Tampón Buffer (10x) a una concentración final de 1x, desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) a 0,5mM cada uno (adenina, guanina, citosina y timina), cloruro de magnesio a 1,5mM, primers a 0,4 μM (cada uno) y Taq-DNA polimerasa a 0,05U. La PCR se hizo en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cyclor (MJ Research).

Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo desnaturalización a $95^{\circ}\text{C}/10\text{min}$, 35 ciclos a desnaturalización a $95^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, 35 ciclos de unión del primer a $57^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, 35 ciclos de extensión a $72^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ y un ciclo final de extensión a $72^{\circ}\text{C}/10\text{min}$.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Agarosa, Roche) en tampón TAE con Red Safe (iNtRON biotechnology) al 5%. Los geles se dejan correr en cubeta de electroforesis a 100V durante 40 min. Se visualizan mediante un transiluminador Vilber Lourmat (09 200272) con luz UV.

El tamaño molecular de los amplicones fue confirmado mediante comparación con el marcador molecular GeneRuler 100-bp DNA Ladder Plus (MBI, Fermentas, Burlington).

Antibiograma cepas de *E. coli*

Para la realización de los antibiogramas se utilizó el método del antibiograma disco-placa del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que detalla el método para el estudio de la susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Se fundamenta en la difusión radial del antimicrobiano a través del agar, formándose un gradiente de concentración en la que, transcurrido el periodo de incubación (24h), se observa un halo de inhibición del crecimiento de la bacteria.

Los antibióticos en disco testeados fueron: gentamicina CN 10µg, amoxicilina/ácido clavulámico AMC 3µg, ampicilina AMP 10µg, amikacina AK 30µg, kanamicina K 30µg, Cloranfenicol C 30µg, cefalotina KF 30µg, ciprofloxacino CIP 5µg, ceftriaxona CRO 30µg, tetraciclina TE 30µg, ácido nalidíxico NA 30µg y estreptomina S 10µg (OXOID antimicrobial susceptibility test disc). Se dispusieron seis discos en cada placa mediante un dispensador de discos (OXOID antimicrobial susceptibility testing disc dispenser). Las placas sembradas y con los discos, se incubaron a 37±1°C durante 24h. Para cada antimicrobiano existen unos diámetros de inhibición estandarizados (CLSI, 2012), expresados en mm. La lectura de los halos de inhibición se interpreta como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI, en referencia comparativa con una cepa control de calidad, se utilizó *E.coli* ATCC 25922. El diámetro de los halos para cada antibiótico, para considerarse como S, I o R son: CN (R: ≤12mm; S: ≥15mm; I: 13-14mm), AMC (R: ≤13mm; S: ≥15mm; I: 14-17mm), AMP (R: ≤13mm; S: ≥17mm; I: 14-16mm), AK (R: ≤14mm; S: ≥17mm; I: 14-16mm), K (R: ≤13mm; S: ≥18mm; I: 14-17mm), C (R: ≤12mm; S: ≥18mm; I: 13-17mm), KF (R: ≤14mm; S: ≥18mm; I: 15-17mm), CIP (R: ≤15mm; S: ≥21mm; I: 16-20mm), CRO (R: ≤13mm; S: ≥21mm; I: 14-20mm), TE (R: ≤14mm; S: ≥19mm; I: 15-18mm), NA (R: ≤13mm; S: 19mm; I: 14-18mm) y S (R: ≤8mm; S: ≥10; I: 7-9mm).

Conservación de cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se congelaron para estudios posteriores en crioviales (Pro-lab Diagnostics Microbank™) a partir de pases de un día de incubación a 37±1°C en placas PCA.

Conjugación

La conjugación se hizo siguiendo el protocolo descrito por Gevers et al., 2003 con las modificaciones oportunas para adecuarlo a nuestro ensayo. Para el inóculo inicial se resuspendieron 3-4 colonias de cepa receptora (*Salmonella*). Se hizo lo mismo para la cepa de *E. coli* (donadora) en 10mL de TSB (Bacto™ Tryptic Soy Broth) durante 24h a 37±1°C. Posteriormente

se transfirieron 10 μ L (ya que la turbidez del tubo sugería una concentración de células de 10^8 - 10^9 céls/mL) a un recipiente con 10mL de TSB y se incubó durante 4h a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Se cogió 1ml del cultivo con 10^4 céls/mL (basándose en la turbidez) y se dispuso en un tubo junto con 1mL del cultivo de la cepa donadora. A partir de aquí se sigue el protocolo descrito por Gevers D. et al., (2003). En lugar de Peptone physiological saline solution se usó APT. Como medio no selectivo líquido se usó el TSB y en agar el Triptone Soy Agar (TSA) (TSB como base + agar-agar, Scharlau Agar-agar). Para la selección de las cepas de *Salmonella* se usó un medio cromógeno (Oxoid *Salmonella* Chromogenic Agar Base + Oxoid *Salmonella* Selective Supplement) y TBX para *E. coli*. Estos medios se realizaron con antibióticos a la concentración mínima inhibitoria equivalente para la concentración de los discos usados en el antibiograma, según indica "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. January 2007" para las *Enterobacteriaceae*. Con esto, se seleccionaron las *Salmonella* que conjugaron con *E. coli* y que obtuvieron resistencia a algunos de estos antibióticos. Los antibióticos usados y sus concentraciones fueron: AMP 64 μ g/mL (Guinama ampicilina trihidrato), Amoxicilina 32 μ g/mL (Sigma Amoxicillin), S 32 μ g/mL (Guinama estreptomocina sulfato), NA 32 μ g/mL (AppliChem Nalidixic Acid) y C 32 μ g/mL (Panreac Chloramphenicol).

La cepa de *Salmonella* es una cepa asilada de pollos en estudios anteriores y sensibles a todos los antibióticos testeados en el antibiograma. Las 2 cepas de *E. coli* usadas como donadoras son dos cepas multiresistentes aisladas durante el ensayo (resistentes a los antibióticos usados para la selección de los conjugantes).

Análisis estadístico

Se utilizó el programa informático "Statgraphics Centurion XVI". Se consideraron como estadísticamente significativos, aquellos análisis con un P-valor menor de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de *E. coli*

Los resultados obtenidos al comparar la carga microbiana al inicio y al final del estudio, mostraron una disminución significativa (P-valor de 0,0366) en el valor de la carga de las muestras en las que hubo crecimiento. Así, tal y como muestra en la figura 1, la práctica totalidad de las muestras iniciales han presentado crecimiento y por el contrario al final del estudio, para la misma dilución las muestras presentan un crecimiento bajo y nulo en la mayoría.

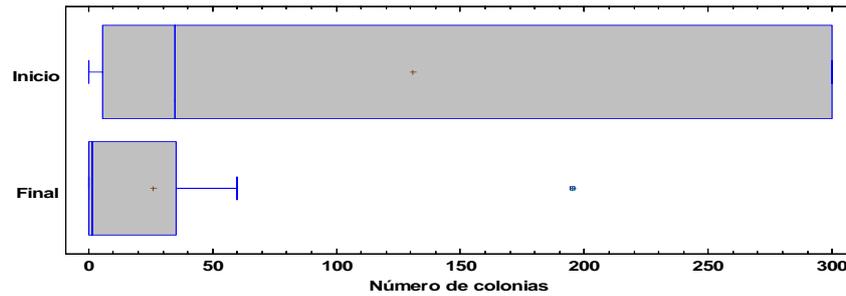


FIGURA 1. Carga de *E. coli* contenida en las heces de los pollos al inicio y final del estudio (cfu/placa)

En la figura 1 se observa una gran disminución en el nivel de crecimiento en las placas entre los dos periodos estudiados. Estos resultados inducen a pensar que el antibiótico administrado ha reducido la carga microbiana intestinal o al menos, su viabilidad. Esta reducción se ha visto en las muestras de todos los pollos, por lo tanto, la dosis de antibiótico, aunque a dosis subterapéuticas es capaz de disminuir la población bacteriana del intestino. Este efecto, es el mismo que generan los antibióticos usados como AGP, y que se usan en dosis subterapéuticas (Cancho Grande, B., *et al* 2000).

Se debe tener presente que no se pudo partir de misma cantidad de muestra a la hora de hacer las diluciones, ya que fue imposible manipular los meconios sin contaminarlos. Por ello, al inicio se hicieron diluciones con una cantidad mayor de muestra que en el final del estudio, donde se pudieron manipular las muestras. Por consiguiente, cabe la posibilidad de que se subestimara la cantidad de células por gramo de muestra en el final del estudio basándose en los meconios del inicio (donde los pollos tenían 1 día de vida).

Sin embargo, en ambos casos se partió de muestras fecales directas donde la carga microbiana es alta. Entonces era de esperar un crecimiento mayor y no se deberían de haber dado tantos casos de muestras sin crecimiento. Así, teniendo todo esto presente, se puede concluir que el antibiótico sí ha tenido efecto en la disminución de la aparición de las colonias. Sin embargo, sería recomendable para estudios posteriores partir en todos los casos de muestras fecales directas. Con ello se podrían partir en todos los muestreos del estudio de cantidades iguales, eliminando la posible interferencia de la cantidad de muestra de partida en los resultados.

Comprobación ausencia de *Salmonella*

El resultado de las pruebas para la detección de *Salmonella* descritas en la norma UNE-EN ISO 6579 2003 “Método de detección horizontal de *Salmonella*” fueron negativas para todas las muestras, así como las PCR de comprobación, hechas de las muestras del último muestreo.

Los resultados indican que los pollos estaban en buen estado de salud. Además, en los ensayos de conjugación para la detección de transferencias de resistencia entre *E. coli* y *Salmonella*, al no haberse detectado *Salmonella* en los pollos, en el caso de que se diesen transferencias hacia *Salmonella*,

estas resistencias no serían originarias de *Salmonella* ni se habrían transferido a *E. coli* desde *Salmonella* en el intestino de los pollos.

Resistencias

Las resistencias obtenidas de las 158 cepas de *E. coli* analizadas durante el estudio a los 12 antibióticos (AK, AMP, AMC, K, CRO, CIP, C, CN, NA, TE, KF y S) fueron muy heterogéneas. Se observaron resistencias en todas las cepas, excepto la 613.2b, que fue sensible a todos menos a AMC y AMP, para los que tuvo un nivel intermedio de sensibilidad.

RESISTENCIA VS DOSIS

Para comparar el grado de sensibilidad con la dosis administrada no se han tenido en cuenta los datos del muestreo 1, ya que en éste no se administró dosis de antibiótico a los pollos y al no tener muestra de todos los pollos, podría alterar los resultados.

Se comparó la prevalencia de los niveles de sensibilidad (sensible, intermedio y resistente) a los antibióticos entre los distintos grupos de dosis, control (C), muy baja (MB), baja (B) y dosis normal (DN). El grupo C fue el que mayor porcentaje de sensibilidades obtuvo respecto al total de muestras del grupo C (70,49%) seguido de MB (65,44%), B (59,26%) y DN (56,25%). El mayor porcentaje de resistencias se dio en el grupo DN (39,81%), seguido de B (38,43%), MB (30,15%) y C (25%).

Si bien el grupo DN fue el que más resistencias tuvo, la diferencia con el grupo B no fue elevada, siendo de 172 y de 166 respectivamente.

Los niveles intermedios de resistencia no fueron importantes para ninguno de los grupos (C (4,51%); MB (4,41%); B (2,31%); DN (3,94%)) representando tan solo un 3,72% en el total de los grupos.

Para el total de las muestras de los grupos, las sensibilidades representaron el 62,12% y las resistencias el 34,17% restante.

Los datos tanto para las sensibilidades como las resistencias, se corresponden a lo esperado al inicio del estudio. Puesto que el grupo de Control no recibió ninguna dosificación de antibiótico, se esperaba que el número de sensibilidades fuese el mayor de todos. El mayor número de resistencias se esperaban para el grupo de DN debido a que fue el sometido a la mayor dosis de antibiótico, y por tanto, la presión selectiva antibiótica era mayor y el número de cepas resistentes seleccionadas se esperaba que fuera el mayor, tal y como se ha podido observar.

Los antibióticos para los que se obtuvo una mayor frecuencia de resistencia fueron, en todos los grupos de dosis AMC, AMP y NA, con una frecuencia de 21,88%, 20,91% y 17,99% respectivamente de las resistencias en el conjunto de los grupos.

Por grupos, las resistencias dominantes en el grupo C son AMC (22), NA (21) y AMP (15). En el grupo MB son AMC (28), AMP (27) y NA (22), además de TE y KF con 17 resistencias cada uno. En el grupo B son AMP (33), AMC (31) y KF (26), NA queda en cuarta posición con 18 resistencias

(a diferencia de los anteriores). Finalmente, en el grupo DN son AMC (35), AMP (35), NA (28) y KF (25).

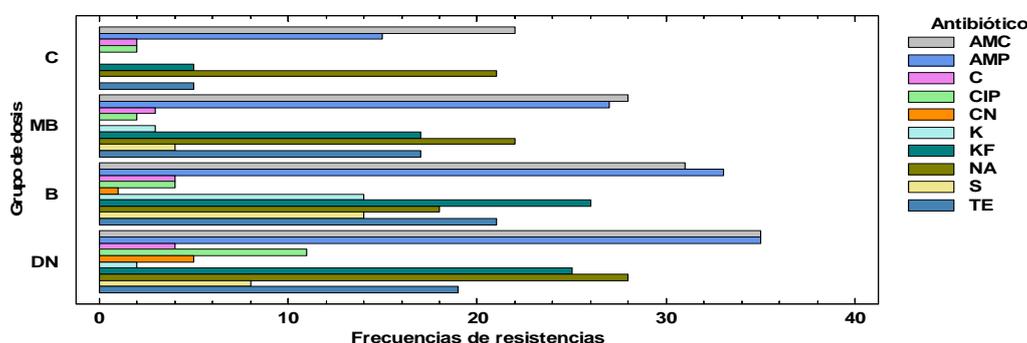


FIGURA 2. R a antibióticos a lo largo del estudio por grupo de dosis

Como el valor-P fue 0,0005, la dosis administrada y el grado de sensibilidad seleccionado están relacionados y las diferencias en las resistencias seleccionadas en función del grupo de dosis son significativas.

Sin embargo, lo más probable y que a la vez puede explicar la elevada presencia de cepas multiresistentes, así como la presencia de resistencias a varios tipos de antibióticos para los que los mecanismos de resistencia son diferentes, es la selección de cepas con elementos genéticos móviles que transporten resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Se sabe que los plásmidos pueden conferir resistencia a b-lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, macrólidos y quinolonas (Carattoli, 2009). Además, los plásmidos al ser elementos genéticos móviles pueden extender las resistencias a otras cepas promoviendo la transferencia horizontal entre bacterias (Thomas and Nielsen, 2005) lo que termina generalizando las multiresistencias en la población de bacterias del intestino.

RESISTENCIAS VS FORMA DE ADMINISTRACIÓN

Se compararon las resistencias y sensibilidades para los dos tipos de administración del antibiótico (oral y bebedero). Para comparar el grado de sensibilidad con el modo de administración no se han tenido en cuenta los datos del muestreo 1, ya que en éste no se administró dosis a los pollos.

En el grupo *Bebedero* (Bb) se obtuvieron un 61,11% de S, 3,55% de I y un 35,34% de R. En el grupo *Oral* (O) fueron de 59,29%, 3,53% y 37,18% respectivamente.

Al comparar la proporción de sensibilidades (61,11% en Bb y 59,29% en O) y de resistencias (35,34% en Bb y 37,18% en O) de ambos grupos, se vio que los resultados eran muy similares. Sin embargo, el grupo *Bebedero* tuvo más sensibilidades (396 frente a 370) mientras que el *Oral* tuvo más resistencias (232 frente a 229). Esto puede hacer pensar que la administración vía oral, al poder controlar mejor la dosis administrada, crea una presión selectiva mayor y favorece así la selección de cepas resistentes por encima de la administración mediante el agua. No obstante, las pequeñas diferencias numéricas que se observan no son estadísticamente

significativas, (P-valor de 0,7899). Por lo tanto, la administración (Oral/Bebedero) no tuvo influencia en el valor del grado de sensibilidad (S, I o R). Así, el tipo de administración y el grado de sensibilidad seleccionado son independientes entre sí.

Los resultados de los antibiogramas mostraron que en las dos formas de administración, fue para AMC y AMP las que más resistencias se encontraron (figura 3). La cantidad de resistencias a cada uno de estos dos antibióticos fue prácticamente la misma en ambos grupos (49 resistencias para AMC y AMP en Bb; 45 y 46 resistencias respectivamente en O).

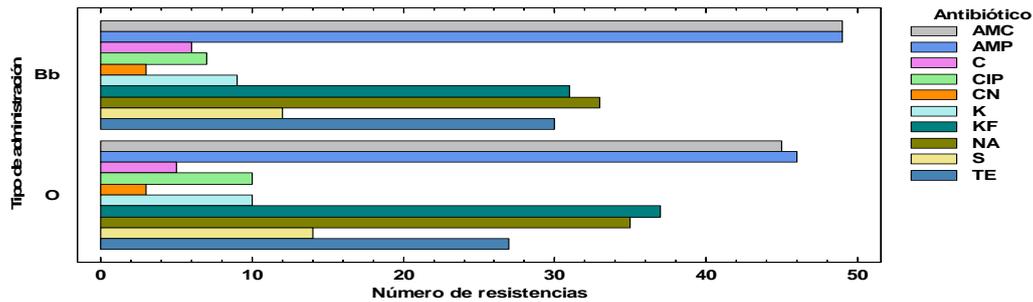


FIGURA 3. Resistencias a antibióticos para cada tipo de administración de antibiótico

Los siguientes antibióticos para los que se obtuvieron un mayor número de resistencias fueron NA (33 en Bb; 35 en O), TE (30 en Bb; 27 en O) y KF (31 en Bb; 37 en O). En el caso de NA y KF tuvieron más resistencias en el grupo O. Mientras que TE tuvo más resistencias en el grupo Bb. Si bien, la diferencia en el número de resistencias para cada antibiótico fue muy similar en ambos grupos y el estudio estadístico indicó que no eran significativas, (P-valor 0,9940). Por lo tanto, el tipo de administración y la resistencia a los antibióticos son independientes.

RESISTENCIAS VS TIEMPO DE TRATAMIENTO

Se analizó la evolución en la selección de las resistencias a lo largo del estudio. El muestreo que presentó un mayor porcentaje de sensibilidades fue el primero, y el que menos, el segundo. Se esperaban un menor número de resistencias en el 4 debido a un mayor tiempo de acción de la presión selectiva. Sin embargo, el muestreo 2 se corresponde con la primera administración del antibiótico y se pudo haber dado un incremento en la variabilidad de las cepas que con el tiempo, se hayan ido seleccionando aquellas con una capacidad de reproducción mayor y se hayan terminado dominando la población, y con ello, haber ido estabilizando las resistencias.

Las diferencias obtenidas en el grado de sensibilidad a los antibióticos en función del tiempo transcurrido, son significativas (P-valor de 0,0036). Por ello, a medida que se incrementa el tiempo el número de resistencias se reduce. Este resultado se da sobre todo por la diferencia en la cantidad de resistencias entre el muestreo 1 y los posteriores, más que por las diferencias entre los muestreos 2, 3 y 4.

El grupo 4 fue de donde menos resistencias se dieron (de los grupos sometidos a tratamiento). Puede ser debido al modo de administración del

antibiótico. La administración no fue diaria durante todo el estudio, sino que fueron 3 administraciones de 3 días consecutivos (1 administración diaria) y 11 días entre cada tratamiento. Ello, pudo conducir a un incremento inicial en la cantidad de cepas resistentes seleccionadas. Sin embargo, como las cepas resistentes tienden a tener una fitness (el NCBI define la fitness como la capacidad de un organismo de sobrevivir y reproducirse; la expresión fenotípica, en un ambiente determinado, del genotipo determina como de adecuado genéticamente será el organismo) menor que las cepas sensibles en condiciones de ausencia de antibiótico, es posible que durante los 11 días entre cada administración, las cepas sensibles hubiesen ido desplazando a las resistentes. Como la administración se daba cada 11 días, es posible también que se tendiese a un equilibrio entre las cepas sensibles y resistentes debido que cada 11 días se irían intercambiando las condiciones favorables para cada tipo de cepa, lo que evitaría el predominio absoluto de las cepas resistentes o de las sensibles.

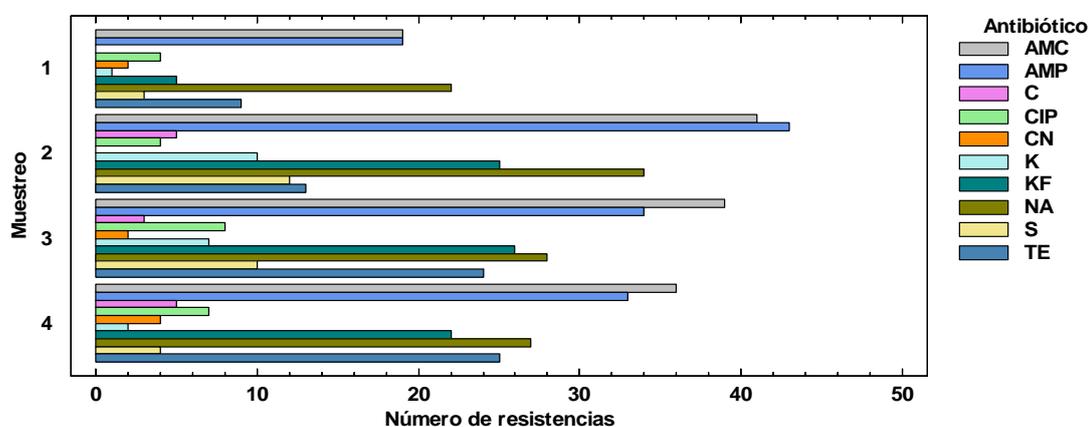


Figura 4. Resistencia a antibióticos para cada muestreo

Como se ve en la figura 4, a medida que transcurrió el estudio, se incrementó la cantidad de resistencias para todos los antibióticos, excepto AK y CRO, para los que no se seleccionaron cepas resistentes en todo el estudio. Este hecho es importante, ya que la CRO está prohibida en la alimentación animal por la normativa europea y por lo tanto, la selección de cepas de cepas resistentes podría indicar un posible uso ilegal en ganadería.

En el muestreo 1 se obtuvo un total de 84 resistencias. En los sucesivos fueron 187 en el muestreo 2, 181 en el muestreo 3 y 165 en el muestreo 4. Un hecho a destacar fue que en el muestreo 1, hecho a partir de los meconios de los pollos de 1 día de vida y sin haber recibido tratamiento antibiótico aún, se observaron bastantes resistencias, sobre todo a AMP, AMC y NA. Estudios como los llevados a cabo por Bortolaia et al (2010) llegaron a la conclusión de que la elevada presencia de cepas resistentes a NA y AMP, en ausencia de presión selectiva aparente, es consecuencia de múltiples introducciones de bacterias resistentes en los sistemas de producción de pollos. Petersen et al. (2006) concluyeron que los progenitores constituyen un elevado reservorio de bacterias y la transmisión hacia la descendencia por la contaminación de la cáscara del huevo es un

riesgo. Estos estudios demuestran el efecto de la transmisión vertical en la expansión de las cepas resistentes.

La presencia de cepas sensibles y resistentes, puede deberse, tal y como han expuesto estudios previos a que las cepas resistentes a AMP y NA persisten igual de bien en la microbiota del intestino que las sensibles; la obtención de resistencia a NA entre las *E. coli* sensibles, es independiente de cualquier fondo genético particular (Johnson et al., 2005; Pleydell et al., 2007; Karami et al., 2008). La resistencia a AMP puede transferirse tanto horizontalmente como verticalmente, lo que facilita su expansión entre las diferentes cepas de la población bacteriana, a diferencia de la resistencia a NA que normalmente se transfiere solo verticalmente (Bradford, 2001; Fàbrega et al., 2008). Esto da más fuerza a la importancia de la transmisión de resistencias de los progenitores a la descendencia y después, mediante presiones selectivas se van seleccionando conjuntamente otras resistencias que vayan juntas en elemento genéticos móviles. Se ha visto también que la resistencia al NA no disminuye la fitness de las cepas resistentes respecto de las cepas sensibles (Bagel et al., 1999; Giraud et al., 1999, 2003; Hopkins et al., 2005) lo que hace que no pierdan peso en la población debido a la resistencia y se mantengan constantes.

Los antibióticos en los que más crece el número de aislados resistentes, son AMC, AMP, KF y TE. En el caso de NA, la cantidad de aislados resistentes se mantiene en valores similares durante todo el estudio, a excepción de en el muestreo 2 donde se da un pico mayor de aislados resistentes.

En el año 2009, los datos de resistencias aves de corral (*Gallus gallus*) fueron el 45% para tetraciclinas, 11% para C, 50% para AMP, 47% para CIP, 40% para S y 44% para NA. El mayor nivel de resistencia para CIP se dio en España (87%) (EFSA y ECDC, 2011). Estos datos están dentro de lo que se ha visto en el estudio, excepto que en nuestro caso, el nivel de resistencia a S fue bastante inferior al 40%. Estos datos sugieren una elevada expansión de las resistencias entre las distintas granjas, así como en los centros de cría de las aves de corral.

Es remarcable el incremento de cepas con resistencia para KF o TE, ya que incrementan su número desde menos de 10 en el primer muestreo, a más de 20 en los posteriores, y esto teniendo presente que la presión selectiva aplicada es para b-lactámicos. Este hecho sugiere también la presencia de elementos genéticos móviles, como plásmidos, portadores de genes de resistencia que se van extendiendo por la población microbiana del ecosistema intestinal.

RESISTENCIAS DURANTE EL ESTUDIO VS GRUPO DE DOSIS

El primer muestreo se excluye de la comparación debido a que aún no se administró dosis de antibiótico a ningún pollo.

Los resultados de resistencias y sensibilidades a lo largo del estudio mostró como en el grupo de control se mantienen más o menos estables. Sin embargo, en los grupos sometidos a tratamiento antibiótico el número de resistencias disminuyó con el paso del tiempo, excepto para el grupo DN,

donde se apreció un incremento en el número final de resistencias respecto del inicio. Este incremento puede ser debido a un efecto mayor de la presión antibiótica sobre la población y por ello, se incrementa el número de resistentes con el tiempo.

Los patrones de resistencias (figura 5) muestran que en el grupo Control se mantienen las resistencias a los mismos antibióticos, excepto por la aparición de resistencia a CIP en el muestreo 3, a C en el 4 y a TE en el 3 y el 4. En los grupos de dosis B y DN la evolución de las resistencias a los diferentes antibióticos sigue un patrón similar en ambos grupos. En éstos, a medida que avanzó el estudio se incrementó la variedad de resistencias a diferentes antibióticos. Además, en el grupo DN el patrón de resistencias fue el mismo para el muestreo 3 que el 4.

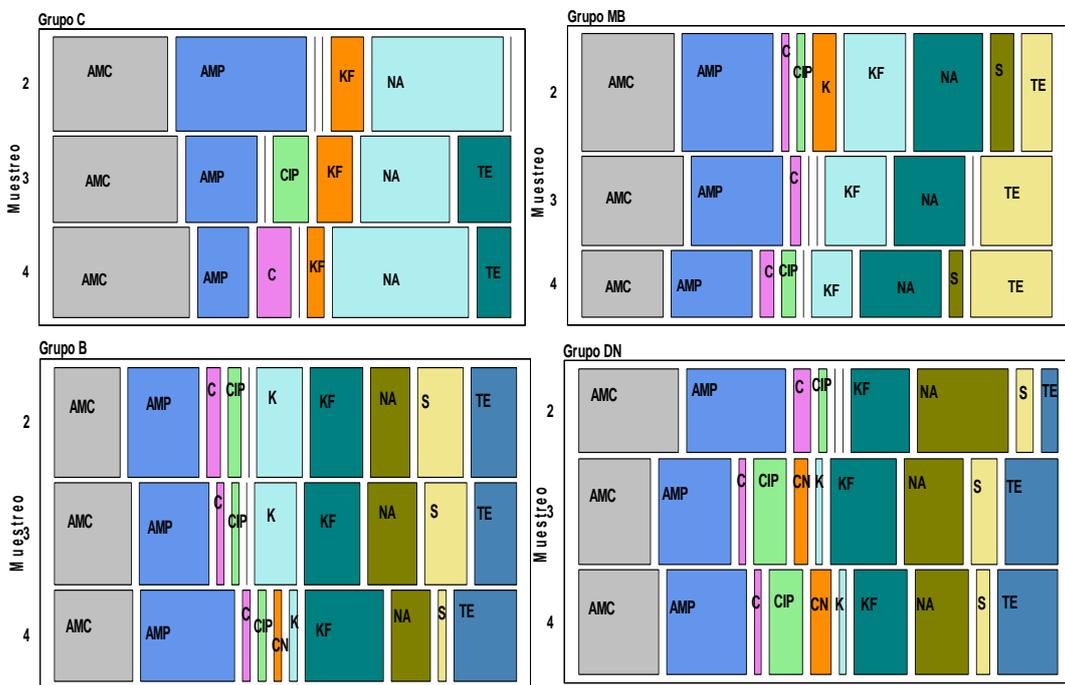


FIGURA 5. Evolución de las resistencias a antibióticos según grupo de dosis en cada muestreo

A medida que transcurre el estudio, el número de resistencias disminuye, pero la variedad de éstas aumenta. Además, las resistencias se van homogenizando. Esto ocurre por una expansión de las cepas que expresan un fenotipo más favorable para las condiciones que se dan en el intestino, ya que estas serán las que más se dividirán y por lo tanto, las que terminan dominando la población bacteriana.

La reducción con el tiempo del número de resistencias (excepto en el grupo DN), puede ser debido a que la presión antibiótica, al darse muy espaciada en el tiempo (cada 11 días) y por espacios cortos de tiempo (durante 3 días) no hace un efecto selectivo lo suficientemente fuerte como para que las cepas resistentes tengan una fitness superior a las salvajes y puedan dominar la población bacteriana. Sin embargo, en el grupo DN, todo y que el modo de administración fue el mismo que en los otros, al ser la dosis terapéutica, la presión selectiva fue más fuerte. Por ello, las cepas

resistentes verían incrementada su fitness lo suficiente respecto a las salvajes, al menos durante los días del tratamiento, como para incrementar su peso en la población bacteriana del intestino e ir dispersando las resistencias a la población. Así, si las resistencias están más esparcidas entre la población, su persistencia será mayor y con las exposiciones posteriores se incrementaría más.

Transferencia genética horizontal

En el ensayo de la conjugación se observó la adquisición de resistencia a S en la *Salmonella* sensible usada como cepa receptora. Esto confirma la presencia de elementos genéticos móviles (EGM) en las cepas de *E. coli* aisladas de los pollos. El antibiograma realizado a ésta *Salmonella*, no mostró la adquisición de resistencia a ninguno de los antibióticos para los que se buscaron resistencias en las *E. coli* aisladas previamente (AMP, AMC, CIP, NA, C, AK, K, CRO, S, TE, KF, CN), a pesar de que el *E. coli* usado como cepa donadora era multirresistente (resistente a AMC, AMP, CIP, CN, KF, NA, S y TE).

Este resultado permite confirmar la presencia de EGM, pero no que estos sean capaces de transferir multirresistencias. Por ello, es posible el EGM adquirido por la *Salmonella* sea un integrón y no un plásmido, ya que los integrones son más pequeños y contienen menos genes que los plásmidos (que son capaces de albergar varios genes).

Se descartó la posibilidad de que la *Salmonella* resistente a S fuese un mutante espontáneo que se hubiese seleccionado durante la incubación en la placa selectiva con S. Se volvieron a sembrar en placas con antibióticos las células obtenidas de los filtros donde se produjo la conjugación, y se volvió a obtener una cepa de *Salmonella* con resistencia a S.

CONCLUSIONES

El uso de antibióticos, incluso a bajas concentraciones hace disminuir la población bacteriana del intestino de los pollos.

Las resistencias están presentes desde el inicio del estudio, los pollos ya son portadores de cepas resistentes transmitidas por los progenitores, sobre todo a ácido nalidíxico y ampicilina y también a amoxicilina-clavulámico.

El número de resistencias en el conjunto de los grupos de pollos disminuye con el tiempo. Sin embargo, por grupos de tratamiento, ésta reducción es menor en aquellos con mayor dosis.

El patrón de resistencias tiende a homogeneizarse. Esto indica una posible selección y expansión de la población de bacterias con el genotipo mejor adaptado para el ambiente generado por la introducción de la presión selectiva del antibiótico (amoxicilina).

La forma de administración (oral o por bebedero) no influye en la cantidad de resistencias seleccionadas.

La transferencia de las resistencias observadas en las cepas de *Escherichia coli* se transfieren a cepas de *Salmonella* previamente sensibles, lo que confirma la presencia de elementos genéticos móviles.

Las principales propuestas de mejora para estudios posteriores son: 1) el tipo de muestra debe ser el mismo en todos los muestreos; 2) Seleccionar más de dos cepas por pollo para analizar el perfil de resistencias. Ya que aunque requiere un mayor tiempo de estudio y de recursos materiales y humanos, aportaran la ventaja de una mejoría en la exactitud de la extrapolación del nivel de resistencias para el resto de la población bacteriana; 3) confirmar mediante técnicas moleculares la presencia de elementos genéticos móviles y de los genes de resistencia para estudiar la relación existente entre las diferentes bacterias de los diferentes muestreos y determinar que genotipo es el que más se extiende, lo que permitiría hacer comparaciones con los resultados obtenidos por otros estudios relacionados con la expansión de las resistencias.

REFERENCIAS

- Aabo S., Rasmussen O.F., Rossen L., Sorensen P.D., Olsen J.E. 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol.Cell.Probes* 7:171-178
- Aarestrup F.M. 1995. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist*, 1:255-257
- Aarestrup F.M., Kruse H., Tast E., Hammerum A.M., Jensen L.B. 2000. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland and Norway. *Microb Drug Resist*, 6:63-70
- Bagel S., Hullen, V., Wiedemann B., Heisig, P. 1999. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and super coiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 868–875
- Balis E., Vatopoulos A.C., Kanelopoulou M. 1996. Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 34, no. 4, pp. 977–979
- Bates J., Jordens J. Z., Griffiths D.T. 1994. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother*, 34:507-514.
- Bortolaia V., Bisgaard M., Bojesen A.M. 2010. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. *Veterinary Microbiology* 142, 379-386
- Bortolaia V., Guardabassi L., Trevisani M., Bisgaard M., Venturi L., Bojesen A.M. 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 1623–1626.
- Bradford P.A. 2001. Extended-spectrum b-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–951
- Bruinsma N, Willems RJ, van den Bogaard AE, van Santen-Verheuve M, London N, Driessen C, Stobberingh E., E. 2002. Different levels of genetic homogeneity in vancomycin-resistant and -susceptible *Enterococcus faecium* isolates from different human and animal sources analyzed by amplified-fragment length polymorphism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.2779-2783
- Burton G.C., Hirsh D.C., Blendon D.C., Zeigler J.L. 1974. The effects of tetracycline on the establishment of *Escherichia coli* of animal origin, and in vivo transfer of antibiotic resistance, in the intestinal tract of man. *Society for Applied Bacteriology symposium series*, vol. 3, no. 0, p. 241–253
- Cancho B., García M.S., Gándara J. 2000. The use of antibiotics in animal feed: an actual perspective. *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol.3, No. 1

- Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2227-2238
- Cavaco L.M., Abatih E., Aarestrup F.M., Guardabassi L. 2008. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, no. 10, pp. 3612–3616
- CE 1831/2003
- Coque T.M., Tomayko J.F., Ricke S.C., Okhyusen P.C., Murray B.E. 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community and animal sources in the United States. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 40:2605-2609
- Diarrassouba F., Diarra M.S., Bach S., Delaquis P., Pritchard J., Topp E., Skura B.J. 2007. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler farms. *Journal of Food Protection* 70, 1316–1327
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA Journal*, 9(7):2154
- Fàbrega A., Sánchez-Céspedes J., Soto S., Vila J. 2008. Quinolone resistance in the food chain. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 307–315
- Fluit A. C. 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*?. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43, 1–11.
- Gambarotto K., Ploy M.C., Dupron F., Giangiobbe M., Denis F. 2001. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol*, 39:2354-2355
- García J.A., Cantón R., García J. E., Gómez M.L., Martínez L., Rodríguez C., Vila J. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*
- Giraud E., Brisabois A., Martel, J.L., Chaslus-Dancla E. 1999. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental *in vitro*- and *in vivo*-selected mutants of *Salmonella spp.* suggest a counter selection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2131–2137
- Glenn L.M., Englen M.D., Lindsey R.L., Frank J.F., Turpin J.E., Berrang M.E. 2012. Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multiple-drug-resistant *Escherichia coli* isolates from broiler chicken carcasses. *Microb. Drug Resist.* 18, 453–463
- Grosso M.D., Caprioli A., Chinzari P., Fontana M.C., Pezzotti G., Manfrin A., Giannatale E.D., Goffredo E., Pantosti A. 2000. Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. *Microb Drug Resist*, 6:313-318
- Guerra, B., Junker, E., Miko, A., Helmuth, R., Mendoza, M.C. 2004. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug Resist.* 10, 83–91.
- Halos de inhibición CLSI. 2004. Valtek S.A.
- Hopkins K.L., Davies R.H., Threlfall E.J. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 358–373
- Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Colodner R., Raul R. 2005. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild-type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4739–4744
- Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., Scaccianoce J.A., Johnson S.J., Nolan L.K. 2006. Complete DNA sequence, comparative genomics, and prevalence of an IncHI2 plasmid occurring among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3929–3933
- Karami N., Hannoun C., Adlerberth I., Wold A.E. 2008. Colonization dynamics of ampicillin-resistant *Escherichia coli* in the infantile colonic microbiota. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 703–708

- Klare I., Heier H., Claus H., Bohme G., Marin S., Seltmann G., Hakenbeck R., Antanassova V., Witte W. 1995. Enterococcus faecium strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist*, 1:265-272.5
- Leverstein-van Hall M.A., Dierickx C.M., Stuart J.C., Voets G.M., van den Munckhof M.P., van Essen-Zandbergen A., Platteel T., Fluit A.C., van de Sande-Bruinsma N., Scharinga J. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect*, 17, 873–880
- McDonald L.C., Rossiter S., Mackinson C., Wang Y.Y., Johnson S., Sullivan M., Sokolow R., DeBess E., Gilbert L., Benson J.A. 2001. Quinupristin-dalfopristin-resistant Enterococcus faecium on chicken and in human stool specimens. *N Engl J Med*, 345:1155-1160
- Petersen A., Christensen J.P., Kuhnert P., Bisgaard M., Olsen J.E. 2006. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. *Vet. Microbiol.* 116, 120–128
- Pleydell E.J., Brown P.E., Woodward M.J., Davies R.H., French N.P., 2007. Sources of variation in the ampicillin-resistant *Escherichia coli* concentration in the feces of organic broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 203–210
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. pag 1-3. Buscar paginas donde están los halos de los antibióticos.
- Radu S., Toosa H., Rahim R.A., Reezal A., Ahmad M., Hamid A.N., Rusul G., Nishibuchi M. 2001. Occurrence of the vanA and vanC2/C3 genes in Enterococcus species isolated from poultry sources in Malaysia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 39:145-153
- Robredo B, Singh K.V., Baquero F., Murray B.E., Torres C. 2000. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int J Food Microbiol*, 54:197-204
- Salyers A.A., Gupta A., Wang Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *TRENDS in Microbiology*, Vol.12 No.9
- Schjørring S., Krogfelt K.A. 2011. Assessment of Bacterial Antibiotic Resistance Transfer in the Gut. *International Journal of Microbiology*. 10 pages doi:10.1155/2011/312956
- Smet A., Martel A., Persoons, D., Dewulf J., Heyndrickx M., Catry B., Herman L., Haesebrouck F., Butaye P. 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 1238–1243
- Thomas C.M., Nielsen K.M. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 711–721
- UNE-EN ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*
- UNE-ISO 16649-1. 2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- Verloo D., Butaye P., Dierick K., Imberechts H. 2003. Descriptive epidemiology of the resistance observed in *Escherichia coli* isolated from healthy cattle, pigs and broilers, their meat and meat products. *Proceedings of the Flemish Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Torhout, Belgium, p. 67
- Verraes C., Van Boxstael S., Van Meervenne E., Van Coillie E., Butaye P., Catry B., de Schaezen M.A., Van Huffel X., Imberechts H., Dierick K., Daube G., Saegerman C., De Block J., Dewulf J., Herman L. 2013. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 2643-2669
- Wegener H.C., Madsen M., Nielsen N., Aarestrup F.M. 1997. Isolation of vancomycin-resistant Enterococcus faecium from food. *International Journal Food Microbiology*, 35:57-66
- Wegner Herik C. 2003. Antibiotic in animal feed and their role in resistance development. *Current opinion in microbiology*, 6:439-445
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Switzerland