

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA**

***Estudio de las de las resistencias
antimicrobianas en E. coli aislados en
producción avícola***

**TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y LA CALIDAD ALIMENTARIA**

JAVIER GÓMEZ-CORNEJO GARCÍA

**TUTOR/A ACADÉMICO: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER
DIRECTOR EXPERIMENTAL: ALEJANDRO FENOLLAR PENADÉS**

Curso Académico: 2017-2018

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2018

ESTUDIO DE LAS DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS EN *E. COLI* AISLADOS EN PRODUCCIÓN AVÍCOLA

Javier Gómez-Cornejo García, Alejandro Fenollar Penadés¹, Ana Isabel Jiménez Belenguer¹.

¹ Departamento de Biotecnología. Universitat Politècnica de Valencia.

RESUMEN

El incremento de consumo de antibióticos en humanos y en veterinaria ha ocasionado un aumento de las resistencias antimicrobianas. El sector avícola, con gran impacto económico, tiene un uso generalizado de antibióticos en sus distintas fases de cría, que hace que microorganismos con resistencias puedan llegar al consumidor. Por tanto, el problema de las resistencias en este sector no sólo lo es a nivel de la producción animal, sino también en la salud humana e incluso en el medio ambiente. El organismo de análisis fue *Escherichia coli* por su capacidad de transmitir resistencias de forma horizontal.

Se analizaron las resistencias antimicrobianas a 9 antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de gallinas reproductoras de distintas edades: de cría (lote A) y de gallinas reproductoras (lote B). Se estudiaron meconios (lote A), heces y calzas. Los resultados mostraron que un 60,91% del total de las cepas de *E. coli* aisladas presentaron resistencia a ampicilina. En el lote A se observaron más resistencias, especialmente en los meconios, con un 97,22% de resistencias a algún antibiótico, pero también para heces y calzas (95,51 y 57,50%, respectivamente).

Se observó mediante el análisis de los meconios que parte de las resistencias se transmiten verticalmente de madres a hijas, aunque también hay que tener en cuenta el factor ambiental. Es por ello que la presencia de microorganismos resistentes en aves de cría puede favorecer la presencia de éstos en los broilers, debido a la transmisión vertical y suponer un riesgo alimentario y un problema de salud pública.

RESUM

L'increment en el consum d'antibiòtics en humans i veterinària ha ocasionat un increment de resistències antimicrobianes. El sector avícola, amb un gran impacte econòmic, té un ús generalitzat d'antibiòtics en les diferents fases de cria, el que fa que microorganismes amb resistències puguin arribar al consumidor. Per tant, el problema de les resistències a aquest sector no és tan sols a nivell de producció animal, sinó que també ho és per a la salut humana i inclús al medi ambient. L'organisme d'anàlisi va ser l'*Escherichia coli* per la seua capacitat de transmetre resistències de forma horitzontal.

Es van analitzar les resistències antimicrobianes a 9 antibiòtics en soques d'*E. coli* aïllades de gallines reproductores de diferent edat: de cria (lot A) i de gallines reproductores (lot B). Es varen estudiar meconis (lot A), excrements i

peücs. Els resultats mostren que un 60.91% del total de les soques d'*E. coli* aïllades presenten resistència a ampicil·lina. Al lot A es van observar més resistències, especialment als meconis, amb un 97.22% de resistències a algun antibiòtic, però també per a excrements i peücs (95.51 i 57.50%, respectivament).

Es va observar mitjançant l'anàlisi dels meconis que part de les resistències es transmeten verticalment de mares a filles, encara que també hi ha que tindre en compte el factor ambiental. Es per això que la presència de microorganismes resistents en aus de cria poden afavorir la presència d'aquests als broilers, degut a la transmissió vertical i suposen un risc alimentari i un problema de salut pública.

ABSTRACT

The increase in the consumption of antibiotics in humans and in veterinary medicine has caused an increase in antimicrobial resistance. The poultry sector, with great economic impact, has a widespread use of antibiotics in its different stages of breeding, which means that microorganisms with resistance can reach the consumer. Then, the problem of resistances in this sector is not only at the level of animal production, but also in human health and even in the environment. The organism of analysis was *Escherichia coli* for its ability to transmit resistances horizontally.

The antimicrobial resistance to 9 antibiotics in strains of *E. coli* isolated from breeding hens of different ages were analyzed: pre-breeding (lot A) and breeding hens (lot B). Meconiums (lot A), feces and sock swabs were studied. The results showed that 60.91% of the total of the strains of *E. coli* isolated showed resistance to ampicillin. In lot A, more resistances were observed, especially in meconiums, with 97.22% resistance to an antibiotic, but also for feces and sock swabs (95.51 and 57.50%, respectively).

It was observed through the analysis of the meconiums that part of the resistances are transmitted vertically from mothers to daughters, although the environmental factor must also be taken into account. That is why the presence of resistant microorganisms in breeding birds can favor the presence of these ones in broilers, due to vertical transmission and can be a food risk and a public health problem.

Palabras clave: resistencias antimicrobianas, producción avícola, transmisión vertical, *E. coli*, gallinas, meconios.

INTRODUCCIÓN

Se calcula que cada año mueren unas 27.000 personas en la Unión Europea debido a infecciones bacterianas resistentes a antibióticos (Watson, 2008), según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades en España entre los años 2011 y 2015 se estima que alrededor de 12.000 personas fallecieron, lo que supone un 10% de las muertes por esta causa en la Unión Europea. Suponiendo además un incremento en un 38% la mortalidad en nuestro país debido a ello (Palumbo y Gama Cubas, 2017).

El problema de las resistencias bacterianas no está solo ocasionado por el consumo excesivo de antibióticos en humanos, sino también por su uso en la industria alimentaria (Cho et al., 2012). España es el país donde se venden más antibióticos para uso veterinario de toda la Unión Europea, según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (Palumbo y Gama Cubas, 2017). Estos antibióticos se utilizan para que el ganado se mantenga libre de enfermedades, el uso de antibióticos para engordar animales está prohibido desde enero de 2006 en toda la Unión Europea (Castanon, 2007), pero su uso excesivo en los animales hace que aumente la probabilidad de que las bacterias desarrollen resistencias a los fármacos (Vuthy et al., 2017). La situación es especialmente grave teniendo en cuenta que muchos de los antibióticos que se utilizan en los animales son de gran importancia para la salud humana. Entre ellos se encuentran la amoxicilina, las cefalosporinas (como la ceftazidima o la cefotaxima) (WHO-AGISAR, 2011) o la ciprofloxacina, quinolona más importante usada para tratar la campilobacteriosis (Skarp et al., 2016).

Además, aparte del peligro que representa que bacterias resistentes puedan encontrarse en alimentos que puedan llegar al consumidor, otro problema a tener en cuenta es que pueden ir acompañadas de un aumento de su virulencia. Esto puede llevar a la recombinación de propiedades de resistencia y virulencia a través de la integración de plásmidos, como se ha observado para *Salmonella* en algunos casos (Fluit, 2005).

La multiresistencia es un fenómeno que se produce cuando una bacteria expresa resistencia a tres o más familias de antibióticos (Basak et al., 2016). Las multiresistencias se producen por mutación espontánea o cuando se transfieren genes de resistencia de una bacteria a otra (Saldarriaga et al., 2015). Es por ello que el uso de antimicrobianos de amplio espectro (pueden actuar frente a un amplio rango de bacterias) provoca una presión selectiva en la microbiota bacteriana, lo que conlleva a un incremento de la selección de bacterias multiresistentes y da como resultado un círculo vicioso de tratamientos y aparición de nuevas bacterias resistentes.

El tracto gastrointestinal humano es un reservorio importante de bacterias con gran potencial para tanto recibir como transferir genes de resistencia a los antibióticos (Schjørring y Krogfelt, 2011). La importancia de la vigilancia de las resistencias en cepas comensales es debida en gran medida al intercambio de genes resistentes que puede ocurrir entre patógenos y no patógenos, incluso

entre organismos gram positivos y gram negativos (McEwen y Fedorka-Cray, 2002). La microbiota intestinal de los animales que han sido tratados con agentes antimicrobianos puede también servir como reservorio de factores de resistencia, siendo de especial interés los enterococos y *Escherichia coli*, que pueden jugar un papel importante en la transmisión de genes móviles de resistencia (Salyers, 1995).

Uno de los mayores problemas de seguridad alimentaria para el hombre en lo referente a bacterias como *Campylobacter* o *Escherichia coli* se encuentra en el sector de producción de carne, y especialmente, en el avícola (Newell et al., 2010). La carne es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos y esto facilita la propagación de bacterias patógenas y no patógenas. Además, la manera más habitual de contaminación es la externa, debido a la contaminación cruzada en el momento del sacrificio y en el procesado de la canal de carne (Gul et al., 2016).

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, de la familia de las Enterobacteriaceae. Su presencia en la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente, y su alta capacidad de producir infecciones intestinales (así como en otros sistemas, como el nervioso o el sanguíneo), la convierten en un microorganismo de referencia a la hora de estudiar su comportamiento, especialmente en cuanto a la seguridad alimentaria se refiere. Un ejemplo de ello sería la aparición de *Escherichia coli* con resistencia adquirida a cefalosporinas de amplio espectro es un problema creciente a nivel mundial (Carattoli, 2008; Coque et al., 2008; Mo et al., 2016). Como anteriormente se ha expuesto, las cefalosporinas son importantes antibióticos utilizados para infecciones en humanos (WHO-AGISAR, 2011), encontrándose un gran número de casos de broilers y gallinas con *E. coli* resistentes a cefalosporinas en broilers y gallinas (Ewers et al., 2012).

Además, el uso de antibióticos en los sistemas de producción agrícola y el posterior uso del estiércol como abono, práctica muy extendida, otorga una vía directa para la introducción de antibióticos, así como de bacterias y genes resistentes a estos, en los agroecosistemas. En un estudio llevado a cabo en un río en el norte de Colorado (Estados Unidos), se comprobó que las áreas cercanas a granjas lecheras tenían mayores concentraciones en genes de resistencia a antibióticos como tetraciclina y sulfonamidas. Además, en los suelos fertilizados con estiércol, existía un aumento transitorio de bacterias con resistencias a antibióticos (Pruden et al., 2006). En general, está claro que las actividades de producción animal, en concreto las que conllevan el uso de antibióticos, pueden aumentar las bacterias y los genes de resistencia a antibióticos en los agroecosistemas (Williams-Nguyen et al., 2016).

Por todo ello, el objetivo de este trabajo es el estudio y caracterización de las resistencias antimicrobianas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de gallinas reproductoras de diferentes edades. A su vez, se busca analizar la prevalencia de la resistencia a distintos antibióticos de uso clínico y estudiar el efecto del ambiente en la aparición de dichas resistencias, las cuales pueden suponer un riesgo para la salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las muestras

Las muestras utilizadas en el estudio se obtuvieron de una explotación comercial de gallinas reproductoras. Dichas muestras se dividieron en dos lotes: el lote A, en el cual, al inicio, las gallinas tenían un día de vida (cría), y el lote B, obtenido inicialmente de gallinas reproductoras con 27 semanas de vida que se encontraban en una granja diferente. De cada uno de los dos lotes, se obtuvieron tres muestras (M1, M2 y M3), de forma que en el lote A se obtuvieron de gallinas jóvenes de cría de 1 día, 4 semanas y 19 semanas de vida, respectivamente. Mientras, en el lote B se obtuvieron de gallinas de reproducción de 27, 30 y 33 semanas de vida para cada muestra. En cada muestra se obtuvieron heces de las gallinas, de las calzas de los trabajadores de la granja (al pisar en el gallinero, se obtiene una mezcla de materiales como paja o las propias heces que se encuentran en el suelo donde habitan las aves) y agua, salvo para la muestra 1 del lote A, que se obtuvieron meconios y las cajas en las que se recogieron éstos dado que las gallinas estaban recién nacidas. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su procesado.

Aislamiento de *Escherichia coli*

A partir del material obtenido de la explotación, se tomaron 25 gramos de cada una de las muestras, y se diluyeron en agua de peptona tamponada (APT) (DIFCO-BDTM, Le Pont de Claix, Francia) para hacer la dilución inicial. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas, con el objetivo de tener colonias aisladas. Se sembró en superficie 0,1 ml por duplicado en placas de agar Triptona-Bilis-X-Glucurónido (TBX) (ScharlauTM, Barcelona, España), que se llevaron a incubar a 44 ± 1 °C durante 24 horas, de forma que se permitiera el crecimiento de *E. coli*. Finalmente, se produjo el recuento de las colonias obtenidas.

Selección de cepas de *Escherichia coli*

Para la selección de cepas se tomaron, de las placas incubadas previamente tal y como se ha descrito en el apartado anterior, 40 colonias aleatorias de cada muestra de entre las que presentaban bordes definidos de color verde azulado, siendo las consideradas como colonias típicas de *E. coli*. Tras esto, se hicieron pases a placas con Plate Count Agar (PCA) (ScharlauTM, Barcelona, España), realizando una siembra en triple estría y dejando incubar a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Para la confirmación, se realizó como prueba bioquímica la prueba del Indol.

Conservación de cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se congelaron para estudios posteriores. Para ello, se hicieron pases a placas con medio Plate Count Agar (PCA) (ScharlauTM, Barcelona, España) para, tras un día de incubación a 37 ± 1 °C, pasar a congelarlas en crioviales (Pro-lab Diagnostics MicrobankTM).

Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* aisladas se completó mediante un estudio por difusión con discos (Test de Discos para Susceptibilidad Microbiana, OXOID™, Inglaterra, Reino Unido) en agar Mueller Hinton (MH) (DIFCO-BD™, Le Pont de Claix, Francia). Las cepas de *E. coli* se enfrentaron a 9 antibióticos diferentes: ácido nalidíxico (NA) 30 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, cloranfenicol (C) 30 µg, estreptomina (S) 10 µg, gentamicina (CN) 10 µg y tetraciclina (TE) 30 µg.

Para la realización de los antibiogramas se utilizó el método del antibiograma disco-placa de acuerdo a las indicaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Las placas sembradas y con los discos dispuestos se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 horas.

Cada antimicrobiano posee un diámetro de inhibición estandarizado (según CLSI, 2012), y se expresan en milímetros. Tras la lectura de los halos de inhibición, se interpretan de tres formas posibles: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R), en base a las referencias dadas por el CLSI. Se usó *E. coli* ATCC 25922 como control. Los niveles de resistencia se determinaron de acuerdo a las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014).

Análisis estadístico

Se realizó una chi cuadrada mediante una tabulación cruzada con los datos de las resistencias antibióticas a los distintos antibióticos empleados y se consideraron como estadísticamente significativos, aquellos análisis con un $p < 0,05$. Así mismo se realizó una ANOVA unifactorial para analizar si los resultados de los antibiogramas en los distintos orígenes, lotes y muestreos eran estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Los cálculos se realizaron con el Software STATGRAPHICS Centurion XVI (Version 16.2.04).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento

Se aislaron un total de 444 cepas de *E. coli*. De éstas, 238 pertenecían al lote A y 206 al lote B. En cuanto al número de cepas según el origen de la muestra, se obtuvieron 35 que fueron aisladas de los meconios y 33 de las cajas en el muestreo 1 del lote A. En heces se aislaron un total de 208 cepas (90 en el lote A y 118 en el lote B), y de las calzas se aislaron 168 (80 en el lote A y 88 en el lote B). En la figura 1 se resumen las cepas obtenidas.

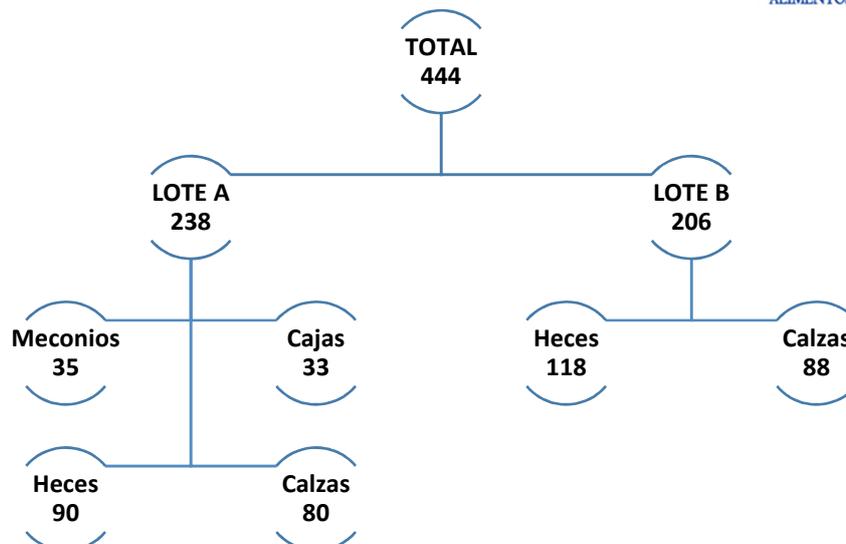


Figura 1. Número de cepas de *E. coli* aisladas en total, por lotes y según la procedencia de la muestra.

Resistencias antimicrobianas

En primer lugar, observamos el porcentaje de resistencias totales (prevalencia) que se detectaron en el conjunto de ambos lotes. El número total de resistencias detectadas fue de 729, lo que equivale a un 18,24 % (frente a un 73,80 % de susceptibles y un 7,96 % de intermedias). Este porcentaje no es el de cepas resistentes, sino el de resistencias que se detectaron a algún antibiótico (cada cepa se expuso a nueve antibióticos).

ANTIBIÓTICO	INTERMEDIAS	RESISTENTES	SENSIBLES
AMP	11	270	163
	2,48%	60,81%	36,71%
C	10	8	426
	2,25%	1,80%	95,95%
CAZ	89	8	347
	20,05%	1,80%	78,15%
CIP	5	20	419
	1,13%	4,50%	94,37%
CN	25	51	368
	5,63%	11,49%	82,88%
CTX	54	33	357
	12,16%	7,43%	80,41%
NA	43	68	333
	9,68%	15,32%	75,00%
S	39	61	344
	8,78%	13,74%	77,48%
TE	42	210	192
	9,46%	47,30%	43,24%

Tabla 1. Prevalencia de resistencias a diferentes antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de gallinas (AMP: ampicilina; C: cloranfenicol; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; CTX: cefotaxima; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomina; TE: tetraciclina).

El porcentaje de cepas que presentaron alguna resistencia a uno, dos o más antibióticos fue del 71,96 % (320/444), mientras que 28,04 % del total de

cepas (124/444) resultaron ser sensibles a todos los antibióticos. Si nos fijamos en la prevalencia (Tabla 1), el antibiótico para el que se detectaron más resistencias fue la ampicilina (AMP), con un 60,91 % de cepas resistentes. Más alejada, pero también destacable, resultó la tetraciclina (TE) con un 47,30 %. Por el lado contrario, los antibióticos que mejores resultados obtuvieron fueron el cloranfenicol (C), con un 95,95 % de cepas sensibles y sólo un 1,80 % de resistentes y un 2,25 % de intermedias, así como la ciprofloxacina (CIP), que obtuvo un 94,37 % de cepas sensibles, un 4,50 % de resistentes y un 1,13 % de intermedias.

La elevada resistencia a ampicilina puede ser debida al excesivo uso de amoxicilina como antibiótico en la granja de gallinas (la amoxicilina y la ampicilina son ambas β -lactámicos y comparten los mismos mecanismos de resistencia), mientras que la resistencia a la tetraciclina podría estar causada por el uso de este mismo antibiótico (Pruksakorn et al., 2016; Van der Bogaard et al., 2000). En el estudio que realizó la EFSA y el ECDC de resistencias en *E. coli* y otros indicadores, también se observó una resistencia frecuentemente alta a ampicilina y tetraciclina (además de a fluoroquinolonas y sulfonamidas, mientras que para las cefalosporinas de tercera generación (como la cefotaxima o la ceftazidima), dicha resistencia era poco frecuente (EFSA, 2018). Esto puede ser debido a que muchas resistencias se encuentran en el mismo elemento genético móvil, plásmido, transposón o integrón, lo que facilita la co-selección de resistencias (Baker-Austin et al., 2006).

Resistencias antibióticas en el Lote A

Dentro del Lote A, gallinas jóvenes de cría, se observan cuáles han sido las resistencias que se han detectado. Se presentan los resultados por origen de la muestra: meconios (incluyen los resultados de las cajas, puesto que se trataron como meconios), heces y calzas.

1) Meconios

En las cepas aisladas procedentes de meconios se observaron un 97,22 % de cepas resistentes (66/68) a 1 o más antibióticos, y tan sólo un exiguo 2,78 % que no mostró ninguna resistencia. En todos los casos de cepas que presentaron alguna resistencia, la ampicilina siempre estuvo presente. Por antibióticos, el resultado fue 100 % de cepas resistentes para ampicilina, 97,14% para tetraciclina, 77,14 % para cefotaxima, 57,14 % para estreptomina, 48,57 % para gentamicina, y un 10,29 % para ceftazidima. En cuanto a multirresistencias, se observó que el 77,79 % de las cepas presentan resistencia a 3 o más antibióticos, siendo sólo un 19,44 % resistentes únicamente a ampicilina y tetraciclina. De entre las cepas que presentaron multirresistencias, el perfil de resistencias más observado fue AMP-TE-CN-CTX-S. Se encontraron resultados similares en el estudio de Martins da Costa et al. (2009), en el cual aparecieron cepas obtenidas de gallinas de un día de vida con resistencias a ampicilina, tetraciclina, estreptomina y gentamicina.

Esta elevada presencia de cepas multirresistentes puede estar debida muy probablemente a que las cepas aisladas de las gallinas tengan las resistencias

a los antibióticos debido a una transmisión vertical, ya que no hubo ningún suministro de antibiótico previo (Jiménez-Belenguer et al., 2016). También puede verse agravada por la contaminación de la granja (Dierikx et al., 2013) o un manejo defectuoso o imperfecto durante la eclosión o *hatching* de los huevos (Kim y Kim, 2010). De acuerdo con Bortolaia et al. (2010), la teoría de la transmisión vertical de las resistencias de madres a hijas es la más consistente, debido a que las diferencias entre las colonias obtenidas de ambos grupos eran indistinguibles.

2) Heces

En cuanto a las heces, se encontraron un elevado porcentaje de cepas que presentaban resistencia a la ampicilina, sola o en presencia de otros antibióticos. En concreto, un 80,90 % de las cepas (73/90) eran resistentes a ampicilina, siendo un 22,47 % correspondiente a la ampicilina en solitario y el resto a combinaciones con los demás antibióticos, donde la más repetida fue la de ampicilina y tetraciclina con un 38,20 %. Solamente un 4,49 % fueron sensibles a todos los antibióticos. En la Tabla 2 se resumen todas las combinaciones obtenidas.

ANTIBIÓTICO	RESISTENCIA %
NA-TE	1,12 %
AMP-TE	38,20 %
AMP	22,47 %
NA-AMP	1,12 %
NA-AMP-TE	7,87 %
TE	14,61 %
AMP-C-CN	1,12 %
AMP-C-TE	1,12 %
AMP-CN	1,12 %
AMP-TE-S	7,87 %

Tabla 2. Combinaciones de resistencias a diferentes antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de heces de gallinas del lote A (AMP: ampicilina; C: cloranfenicol; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomycin; TE: tetraciclina).

Según el estudio realizado por Jensen et al. (2018), las resistencias cruzadas en antimicrobianos de uso común, tales como la tetraciclina, la ampicilina o la estreptomycin, pueden mantener las resistencias a otras familias de antimicrobianos químicamente distintas. La co-resistencia pudo ser la razón de la presencia de resistencia a los antibióticos críticos importantes para el tratamiento humano en *E. coli* en cerdos daneses, después de que la industria hubiese dejado de usar dichos antimicrobianos. De esta forma, la eliminación de la prevalencia de resistencia antimicrobiana no deseada se hace extremadamente difícil. La resistencia cruzada que se produjo entre ampicilina y las cefalosporinas de tercera generación hace pensar que el uso de ampicilina puede mantener la resistencia ya adquirida a estos antimicrobianos críticos de importancia. Los resultados del estudio de Jensen et al. coinciden con el resultado obtenido para ampicilina en este estudio, por lo que la teoría de la co-resistencia se refuerza.

3) Calzas

El principal antibiótico para el que se encontraron resistencias en la muestra 2 fue el ácido nalidíxico, con un 22,5 % de cepas (18/80), el mismo porcentaje que para aquellas que no presentaron resistencia a ninguno de los antibióticos suministrados. En segundo lugar, se obtuvo un 17,5 % de cepas resistentes a ampicilina. Más alejadas, con un 7,5 y un 5 % respectivamente, quedaron las combinaciones de AMP-C-CN-CTX y AMP-C-CN. Para el muestreo 3, un 37,5 % de cepas presentaron resistencia a ampicilina, mientras que el resto, en porcentajes mucho más bajos, fueron combinaciones de ampicilina con otros antibióticos. Mientras, un 42,5 % de cepas no presentaron resistencia a ninguno de ellos. En la figura 2 se resumen en las dos gráficas los resultados de ambos muestreos.

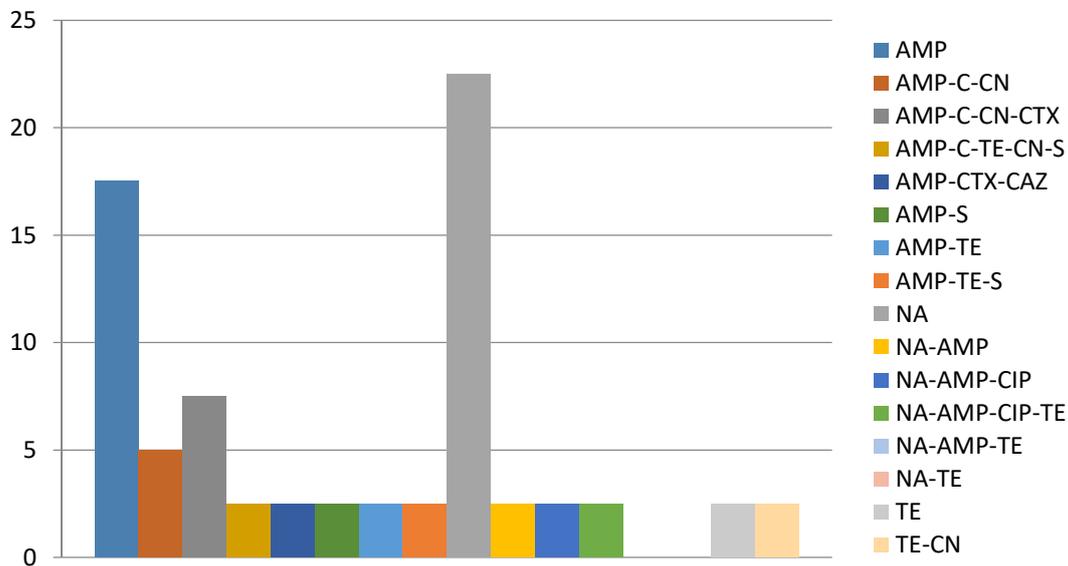


Figura 2. Combinaciones de resistencias a diferentes antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de calzas de gallinas del lote A para el muestreo 2 (AMP: ampicilina; C: cloranfenicol; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; CTX: cefotaxima; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomina; TE: tetraciclina).

En este caso, se observaron menos multirresistencias que para las heces. Esto puede deberse a que, en el suelo y el ambiente, las bacterias tienen una tasa de supervivencia menor, debido a su susceptibilidad a la depredación, inanición o por la acción de microorganismos líticos (Acea et al., 1988), de forma que se considera a *E. coli* un indicador de contaminación fecal reciente. Se ha supuesto tradicionalmente que *E. coli* muestra disminuciones naturales en entornos abiertos. Sin embargo, al formar un reservorio ambiental de un tamaño dado en diferentes condiciones, pueden existir riesgos para la salud humana. Los factores que determinan la tasa de supervivencia de determinadas cepas de *E. coli*, y por lo tanto los riesgos, no son todavía fácilmente predecibles, por lo que comprender los efectos del hábitat secundario (especialmente en el suelo y agua) en *E. coli* serán importantes para poder manejar el organismo desde perspectivas ambientales y de salud pública (Van Elsas et al., 2010).

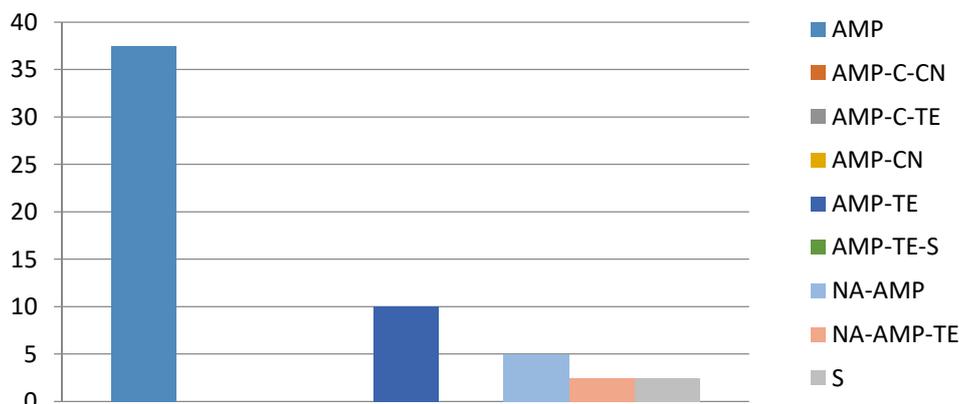
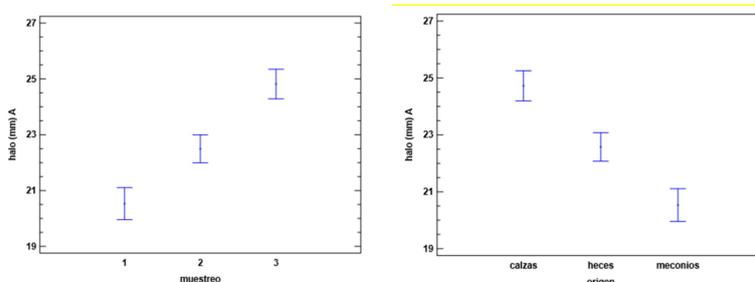


Figura 3. Combinaciones de resistencias a diferentes antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de calzas de gallinas del lote A para el muestreo 3 (AMP: ampicilina; C: cloranfenicol; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; CTX: cefotaxima; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomycin; TE: tetraciclina).

Se analizaron los datos mediante una chi cuadrada, comparando los porcentajes de resistencias para cada antibiótico, así como las medias de los halos obtenidos en los antibiogramas. Cada antibiótico tiene un rango distinto en los halos para determinar si la cepa era resistente, intermedia o sensible, pero permite dar una idea de cuáles son los antibióticos que han presentado mayor número de resistencias. Comparando los porcentajes de resistencias, y observando los P-valor, se vio que existen diferencias significativas para AMP, TE, CTX, CN, NA, S y CAZ al comparar meconios con heces y meconios con calzas, mientras que sólo existen para AMP, TE y CTX al comparar heces con calzas.

Con el fin de comparar los valores de resistencia antibiótica (medida de los halos en mm) entre los distintos orígenes y muestreos, se realizaron varios ANOVA que manifestaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas en todos los casos, como se puede observar en las gráficas que muestran los intervalos LSD (figuras 4 y 5). Se observó que hay diferencias significativas en todos los muestreos, así como entre los tres orígenes, observándose los valores menores en diámetro de halo que corresponden a los valores de resistencia antibiótica.



Figuras 4 y 5. Análisis de medias e Intervalos LSD correspondientes a los ANOVA realizados al comparar los valores de resistencia antibiótica (halos mm) en los distintos muestreos (4, izda.) y orígenes (5, dcha.) en el lote A.

Resistencias antibióticas en el Lote B

Dentro del Lote B, gallinas reproductoras, se observan cuáles han sido las resistencias que se han detectado. Se presentan los resultados por origen de la muestra: heces y calzas.

1) Heces

En las heces, nuevamente se obtuvieron un elevado porcentaje de cepas con resistencia únicamente a ampicilina, un 17,80 % (21/118), así como a ampicilina con otras combinaciones de antibióticos (destacando 11,86 % para NA-AMP-CIP-TE y 10,17 % para AMP-TE). Un 32,20 % de las cepas no presentaron ninguna resistencia, un valor mucho más alto que en el lote A, donde no llegaba al 5 %. Por antibióticos, se obtuvo un 47,46 % de cepas resistentes a ampicilina, 44,07 % para tetraciclina, 28,81 % para ácido nalidíxico, 12,71 % para ciprofloxacina, 2,54 % para estreptomina y 0,85 % para gentamicina. Además, del 67,80 % de cepas que presentaron alguna resistencia, un 18,64 % fueron multirresistentes, siendo la combinación más repetida NA-AMP-CIP-TE.

ANTIBIÓTICO	RESISTENCIA %			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	TOTAL
AMP	22,22 %	11,43 %	17,5 %	17,80 %
AMP-TE	20 %	2,86 %	5 %	10,17 %
AMP-TE-CN	2,22%	0 %	0 %	0,85 %
AMP-TE-S	2,22%	0 %	0 %	0,85 %
NA	4,44%	2,86 %	5 %	4,24 %
NA-AMP	0 %	2,86 %	0 %	0,85 %
NA-AMP-CIP-TE	11,11 %	22,86 %	2,5 %	11,86 %
NA-AMP-TE	6,67 %	8,57 %	0 %	5,08 %
NA-CIP-TE	0 %	2,86 %	0 %	0,85 %
NA-TE	2,22 %	0 %	15 %	5,93 %
S	0 %	0 %	2,5 %	0,85 %
S-TE	0 %	2,86 %	0 %	0,85 %
TE	4,44 %	2,86 %	15 %	7,63 %

Tabla 3. Combinaciones de resistencias a diferentes antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de heces de gallinas reproductoras del lote B según la muestra y en todo el conjunto (AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomina; TE: tetraciclina).

Observando las resistencias según el muestreo se puede ver la variación en el tiempo de estas. Se pudo comprobar un ligero descenso de las resistencias para ampicilina, mientras que para tetraciclina se observó un notable aumento para la muestra 3, pasando de porcentajes bajos a un 15 % de cepas resistentes para este antibiótico en solitario o en combinación con el ácido nalidíxico. En la Tabla 3 se resumen los porcentajes de resistencias para cada muestra y en total en el Lote B.

2) Calzas

En el Lote B no se aislaron cepas para la muestra 3, solo para la 1 y 2. El principal antibiótico para el que se encontraron resistencias en las calzas del Lote B fue la ampicilina, con un 18,18 % (16/88). Si observamos el resultado según la muestra, se obtuvo un 31,11 % para ampicilina en la muestra 1 y un 4,35 % en la muestra 2, siendo este último porcentaje muy similar al de otras combinaciones de antibióticos. En segundo lugar, se obtuvieron un 6,82 % de cepas resistentes a ampicilina y tetraciclina. Un 56,82 % no presentaron ninguna resistencia a alguno de los antibióticos testados. Por antibióticos, se obtuvieron un 36,36 % de cepas resistentes a ampicilina, 19,32 % a tetraciclina, 11,36 % a ácido nalidíxico, 3,41 % a ciprofloxacina, 2,27 % a estreptomicina y 1,14 % a cefotaxima y gentamicina. Del 43,18 % que presentaron alguna resistencia, sólo un 6,82 % de las mismas presentaron multiresistencia, siendo la combinación más repetida NA-AMP-CIP-TE, al igual que sucedía con las heces del Lote B, con un 3,41 %. En las figuras 6 y 7 se resumen los porcentajes obtenidos para cada muestra en el lote B.

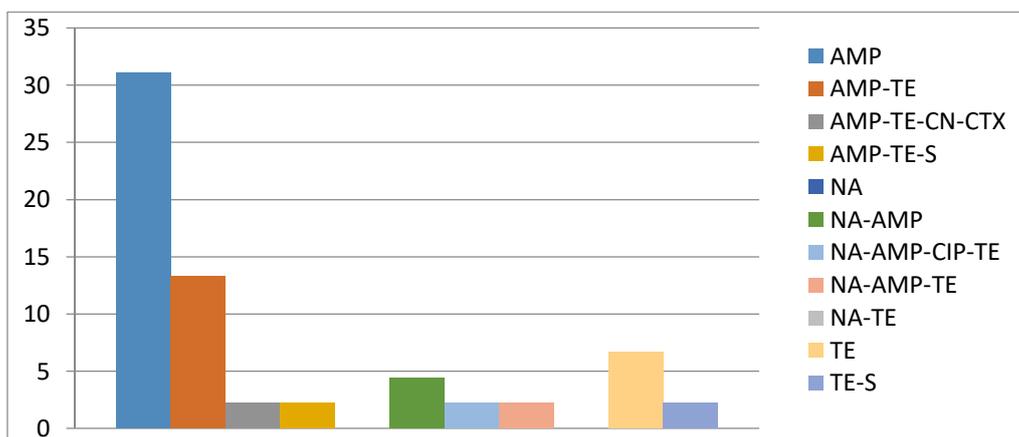


Figura 6. Combinaciones de resistencias a diferentes antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de calzas de gallinas del lote B para el muestreo 1 (AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; CTX: cefotaxima; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomicina; TE: tetraciclina).

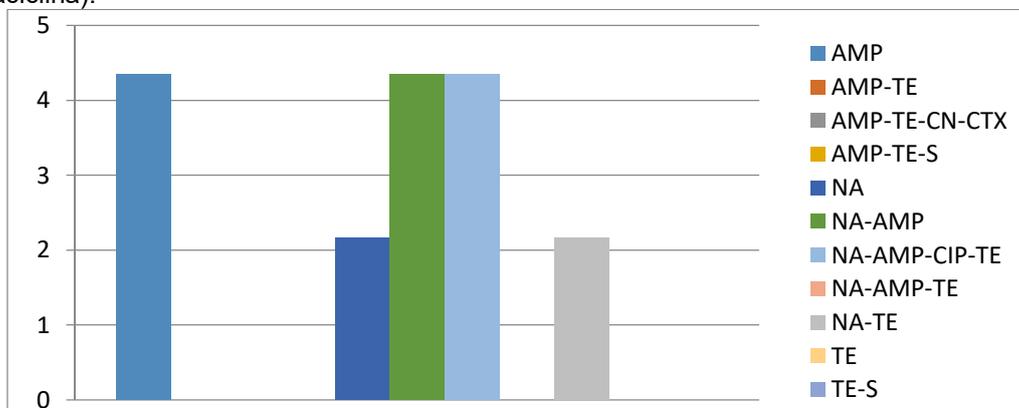
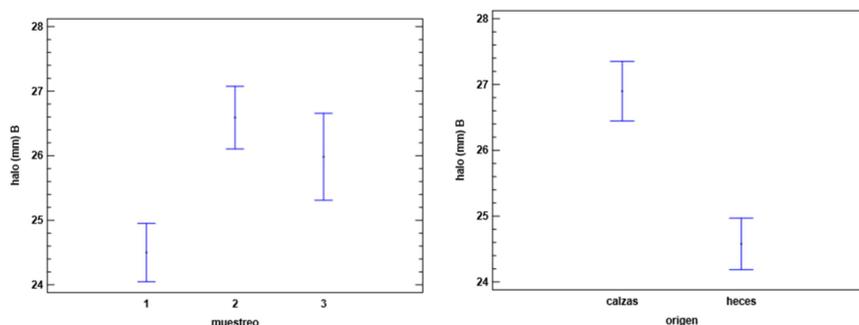


Figura 7. Combinaciones de resistencias a diferentes antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de calzas de gallinas del lote B para el muestreo 2 (AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; CTX: cefotaxima; NA: ácido nalidíxico; S: estreptomicina; TE: tetraciclina).

Nuevamente, se observaron menos multirresistencias en las calzas que en las heces debido en parte a la baja tasa de supervivencia bacteriana en el suelo y el ambiente. Los dos antibióticos que presentan más resistencia en casi todos los casos fueron ampicilina y tetraciclina, especialmente el primero. Los β -lactámicos tienen varios mecanismos de resistencia, siendo uno de ellos debido a la producción de una enzima β -lactamasa o penicilinas, que hidroliza el anillo β -lactámico y haciéndolo inefectivo. Los genes que codifican estas enzimas pueden adquirirse mediante un plásmido o estar presentes en el material genético de la bacteria (Drawz & Bonomo, 2010). Esto supone un riesgo en los humanos, ya que los β -lactámicos es una de las familias de antibióticos más usadas para tratar infecciones bacterianas (Crowder et al., 2006). Es por ello que suelen ser administrados con inhibidores de β -lactamasa, como el ácido clavulánico con la amoxicilina (hay que recordar que se usa habitualmente en granjas de gallinas), de forma que ésta no se vea afectada por la acción de las enzimas (Leonard et al., 2013).

La pérdida de tratamientos efectivos con antibióticos debido a las resistencias tiene no sólo impacto en las implicaciones clínicas, como el aumento de la mortalidad, la reducción de la eficacia de los antibióticos o el incremento de la aparición y diseminación de patógenos que afecten al ser humano (World Health Organization Study Group, 2002), sino también en otros aspectos. También hay consecuencias económicas debido al incremento en los costes de los tratamientos y la estancia de los pacientes en hospitales para ser tratados (Bengtsson & Greko, 2014), así como consecuencias para el medio ambiente, como la contaminación del suelo y el agua (Cole et al., 2000).

Una vez analizados los datos del lote B se obtuvieron los P-valor mediante una chi cuadrada, observando que sólo CIP, NA y TE mostraron diferencias significativas al comparar los porcentajes de resistencias obtenidos en heces y calzas. Una vez realizado el ANOVA se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el muestreo 1 y los muestreos 2 y 3, pero no entre estos. En el muestreo 1 sí se había observado mayor número de resistencias que en los posteriores posiblemente debido a las resistencias transmitidas por las progenitoras. También se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos orígenes ($p < 0,05$), coincidiendo con la presencia de más resistencias en heces que en calzas.



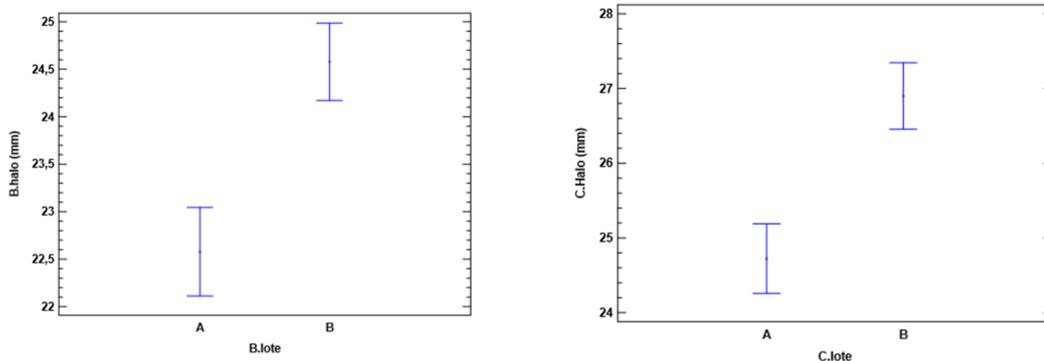
Figuras 8 y 9. Análisis de medias e Intervalos LSD correspondientes a los ANOVA realizados al comparar los valores de resistencia antibiótica (halos mm) en los distintos muestreos (8, izda.) y orígenes (9, dcha.) en el lote B.

Resistencias antibióticas en gallinas de recría vs gallinas reproductoras

Comparando el lote A con el B se pueden ver las similitudes y diferencias entre las resistencias obtenidas en las gallinas de recría y las reproductoras, y ver cómo evolucionan en el tiempo y con el cambio de ambiente. Para la comparación, se enfrentaron heces de un lote con heces del otro, así como para las calzas. Los meconios no se tuvieron en cuenta debido a que el impacto de 1 día frente a las semanas de vida no se considera.

Observando los porcentajes de cepas resistentes a cada antibiótico, en las heces se obtuvieron los P-valor mediante una chi cuadrada y se apreciaron diferencias significativas para AMP, TE, CIP y NA, mientras que para las calzas se encontraron en AMP, C y CN.

El ANOVA realizado puso de manifiesto que en ambos casos tanto en heces como en calzas los valores eran estadísticamente significativos, encontrándose en ambos que en el lote A las medias fueron siempre menores y por consiguiente se encontraron mayor número de resistencias independientemente del tipo de origen de la muestra: heces o calzas. En las figuras 10 y 11 se pueden observar los intervalos obtenidos para cada origen en los distintos lotes.



Figuras 10 y 11. Análisis de medias e Intervalos LSD correspondientes a los ANOVA realizados al comparar los valores de resistencia antibiótica (mm) de las heces de los lotes A y B (10, izqda..) y de las calzas (11, dcha.).

Para las heces hay diferencias significativas, y se observa cómo claramente hay un mayor número de resistencias en las gallinas de cría que en las reproductoras, de igual forma que sucede para las calzas. Esto lleva a pensar que, por un lado, la mayoría de resistencias vienen adquiridas por la propia gallina (pese a no tener en cuenta los meconios, que era donde más resistencias aparecieron, los resultados arrojan grandes diferencias entre un lote y otro). Por otro lado, la contaminación ambiental no es tan acusada y las resistencias por este motivo (en las calzas) disminuyen al pasar las gallinas de una granja a otra.

CONCLUSIONES

Las resistencias a los antibióticos se encuentran presentes desde el nacimiento de las gallinas. Las madres las transmiten a las hijas, ya que en los análisis de los meconios se obtuvieron una alta cantidad de resistencias, donde las recién nacidas aún no habían recibido suministro de antibiótico de ningún tipo. La cantidad de resistencias a la ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico fueron especialmente altas al igual que a las combinaciones de ellas entre sí o con otros antibióticos.

El número de resistencias en ambos lotes y a lo largo del tiempo disminuye de forma general. Sin embargo, según el antibiótico esta disminución no se produce como en el caso de ampicilina que mantiene el nivel de resistencia en todos los orígenes y lotes.

Aparece un mayor número de resistencias en las cepas aisladas de heces que en las calzas, debido a que *Escherichia coli* no presenta tanta supervivencia en el suelo o el ambiente como en el tracto intestinal. Por tanto, el manejo de las heces y su eliminación en el ambiente debe de considerarse de forma adecuada para no incrementar la carga ambiental de bacterias con resistencia antibiótica.

Las resistencias en las cepas obtenidas de las calzas disminuyen de un lote a otro debido al cambio de ambiente una vez que las gallinas pasan de cría a reproducción una vez son adultas. Por tanto, aunque el factor ambiental también es determinante para la selección de las resistencias, el principal factor desencadenante es el suministro de antibióticos a las gallinas y la transmisión vertical de madres a hijas.

La administración de antibióticos puede causar la selección de las cepas de microorganismos resistentes presentes en las aves de cría, lo que puede favorecer la transmisión de cepas resistentes desde las gallinas reproductoras hasta los broilers debido a la transmisión vertical y suponer un riesgo alimentario y un problema de salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Acea, M.J.; Moore, C.; Alexander, M. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biology and Biochemistry*. Volume 20, Issue 4, 509-515.
- Amiranashvili, L. L.; Gagelidze, N. A.; Varsimashvili, K. I.; Tinikashvili, L. M.; Tolordava, L. L.; Gamkrelidze, M. D.; Amashukeli, N. V.; Makaradze, L. 2016. Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance profiles of cultivable lactic acid bacteria from intestinal tract of domestic chickens collected in Adjara. *Annals of Agrarian Science*, Volume 14, Issue 3, 182-186.
- Antunes, P.; Mourão, J.; Campos, J.; Peixe, L. 2016. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 22, Issue 2, 110-121.
- Baker-Austin, C.; Wright, M.S.; Stepanauskas, R.; McArthur, J.V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 2006 Apr 14 (4), 176-182.
- Basak, S.; Singh, P.; Rajurkar, M. 2016. Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: a study. *Journal of Pathogens*. Volume 2016, 5.
- Bengtsson, B; Greko, C. 2014. Antibiotic resistance – consequences for animal health, welfare, and food production. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 119 (2), 96-102.

- 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.
- Carattoli, A. 2008. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 14. 117-123.
- Castanon, J. I. R. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, Volume 86, Issue 11, 2466-2471.
- Cho, S.-H.; Lim, Y.-S.; Kang, Y.-H. 2012. Comparison of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from healthy poultry and swine farm workers using antibiotics in Korea. *Osong Public Health and Research Perspectives*, Volume 3, Issue 3, 151-155.
- Cole D.; Todd, L.; Wing, S. 2000. Concentrated Swine Feeding Operations and Public Health: A Review of Occupational and Community Health Effects. *Environmental Health Perspectives*. 108(8): 685-699.
- Coque, T. M.; Baquero, F.; Canton, R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*, 13. 1-11.
- Crowder, M.W.; Spencer, J.; Vila, A.J. 2006. Metallo- β -lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Accounts of Chemical Research*, 39 (10), 721-728.
- De Goede, D.; Gremmen, B.; Bas Rodenburg, T.; Bolhuis, J. E.; Bijma, P.; Scholten, M.; Kemp, B. 2013. Reducing damaging behaviour in robust livestock farming. *NJAS – Wageningen Journal of Life Sciences*, Volume 66, 49-53.
- Dierikx, C.M.; Van der Goot, J.A.; Smith, H.E.; Kant, A.; Mevius, D.J. 2013. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One*, 8, e79005.
- Domínguez, J. E.; Figueroa Espinosa, R. A.; Redondo, L. M.; Cejas, D.; Gutkind, G. O.; Chacana, P. A.; Di Conza, J. A.; Fernández-Miyakawa, M. E. 2017. Existencia a colistina mediada por plásmido en *Escherichia coli* recuperadas de aves de corral sanas. *Revista Argentina de Microbiología*, Volume 49, Issue 3, 297-298.
- Drawz, S.M.; Bonomo, R.A. 2010. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (1): 160-201.
- EFSA. 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. European Food Safety Authority, Parma, Italy.
- Ewers, C.; Bethe, A.; Semmler, T.; Guenther, T.; Wieler, L. H. 2012. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals: and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 18. 646-655.
- Fluit A. C. 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant Salmonella?. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43, 1–11.
- Gul, K.; Singh, P.; Wani, A. A. 2016. Regulating safety of traditional and ethnic foods. Chapter 4, 63-77.
- Jensen, L.B.; Birk, T.; Borck Høg, B.; Stehr, L.; Aabo, S.; Korsgaard, H. 2018. Cross and co resistance among Danish porcine *E. coli* isolates. *Research in Veterinary Science*, Volume 119, 247-249.
- Jiménez-Belenguer, A.; Doménech, E.; Villagrà, A.; Fenollar, A.; Ferrús, M. A. 2016. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newborn chickens and effect of amoxicillin treatment during its growth. *Avian Pathology*, DOI: 10.1080/03079457.2016.1168515.
- Kim, J.H.; Kim, K.S. 2010. Hatchery hygiene evaluation by microbiological examination of hatchery samples. *Poultry Sci.*, 89, 1389-1398.
- Leonard, D.A.; Bonomo, R.A.; Powers, R.A. 2013. Class D β -Lactamases: A Reappraisal after Five Decades. *Accounts of Chemical Research*, 46 (11), 2407-2415.
- Manges, A.R. 2016. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 22, Issue 2, 122-129.

- Martins da Costa, P.; Belo, A.; Gonçalves, J.; Bernardo, F. 2009. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. *Veterinary Microbiology*, 139, 284–292.
- McEwen, S. A.; Fedorka-Cray, P. J. 2002. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34, S93–106.
- Mo, S. S.; Kristoffersen, A. B.; Sunde, M.; Nødtvedt, A. 2016. Risk factors for occurrence of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Norwegian broiler flocks.
- Newell, D. G.; Koopmans, M.; Verhoef, L.; Duizer, E.; Aidara-Kane, A.; Sprong, H.; Opsteegh, M.; Langelaar, M.; Threlfall, J.; Scheutz, F.; Van der Giessen, J.; Kruse, H. 2010. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago persist while the new ones continue to emerge. *International Journal of Microbiology*, Volume 139, Supplement, S3-S15.
- Overvest, I.; Willemsen, I.; Rijnsburger, M.; Eustace, A.; Xu, L.; Hawkey, P.; Heck, M.; Savelkoul, P.; Vandembroucke-Grauls, C.; Van der Zwaluw, K.; Huijsdens, X.; Kluytmans, J. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 17. 1216-1222.
- Palumbo, O.; Gama Cubas, M. 2017. “España encabeza el consumo de antibióticos veterinarios críticos para la salud humana”. *Diario El Mundo*. URL: <<http://www.elmundo.es/ciencia-ysalud/2017/08/16/598b3d0e22601d3b7b8b4591.html>>
- Palumbo, O.; Gama Cubas, M. 2017. “Una de cada diez muertes por resistencia a los antibióticos en la UE ocurre en España”. *Diario El Mundo*. URL: <<http://www.elmundo.es/salud/2017/08/16/598b1cade5fdea03678b45cc.html>>
- Pruden, A.; Pei, R.T.; Storteboom, H.; Carlson, K.H. 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7445-7450.
- Pruksakorn, C.; Pimarn, C.; Boonsoongnorn, A.; Narongsak, W. 2016. Detection and phenotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in pigs in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, Volume 50, Issue 3. 199-203.
- Saldarriaga, E.; Echeverri-Toro, L.; Ospina, S. 2015. Clinical factors associated with bacterial multidrug resistance in a quaternary care hospital. Volume 19, Issue 4, 161-167.
- Salyers, A. A. 1995. Antibiotic resistance transfer in the mammalian intestinal tract: implications for human health, food safety and biotechnology.
- 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.
- Skarp, C. P. A.; Hänninen, M.-L.; Rautelin, H. I. K. 2016. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 22, Issue 2, 103-109.
- Van der Bogaard, A. E.; London, N.; Stobberingh, E. E. 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J. Antimicrob. Chemother.* 45. 663-671.
- Van Elsas, J.D.; Semenov, A.V.; Costa, R.; Trevors, J.T. 2010. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. 5 (2), 173-183.
- Vuthy, Y.; Lay, K. S.; Seiha, H.; Kerleguer, A.; Aidara-Kane, A. 2017 Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among *Escherichia coli* and among *Salmonella* subsp. in chicken food chains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 7, Issue 7, 670-674.
- Watson, R. (2008). Multidrug resistance responsible for half of deaths from healthcare associated infections in Europe. *British Medical Journal*, 336, 1266-1267.
- World Health Organization Study Group. 2002. Future trends in veterinary public health. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 907:1-85.
- WHO-AGISAR, 2011. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine – 3rd Rev. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Williams-Nguyen, J.; Sallach, J.B.; Bartelt-Hunt, S.; Boxall, A.B.; Durso, L.M.; McLain, J.E.; Singer, R.S.; Snow, D.D.; Zilles, J.L. 2016. Antibiotics and antibiotic resistance in agroecosystems: State of the science. *Journal of Environmental Quality*, 394-406.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

Winokur, P. L.; Vonstein, D. L.; Hoffman, L. J.; Uhlenhopp, E. K.; Doern, G. V. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45. 2716-2722.