



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

---

**Estudio de la transmisión de resistencias a antibióticos  
mediante métodos moleculares en el sector avícola y  
su implicación para la salud pública**

---

TESIS DOCTORAL

Doctorado en Biotecnología

**Autor:**

Alejandro Fenollar Penadés

**Directoras:**

Dra. Ana Isabel Jiménez Belenguer

Dra. María Antonia Ferrús Pérez

Valencia, marzo de 2020

## Agradecimientos

Me gustaría empezar dando las gracias a mis directoras, las doctoras Ana Jiménez y María Antonia Ferrús, tanto por haberme aceptado para la realizar los estudios bajo su dirección como por su ayuda y el tiempo que han dedicado en todas las etapas de la tesis. Aparte de mis directoras, esta tesis ha sido posible gracias al trabajo de la doctora Eva Doménech, que fue con quien se empezó el estudio preliminar que ha llevado a esta tesis y que ha sido de gran ayuda para la interpretación de parte de los resultados y las publicaciones derivadas.

Me gustaría también agradecer el trabajo del personal de laboratorio, Nancy, Ana y demás miembros del departamento, gracias a quienes he podido disponer de todo el material necesario para los ensayos y que me han ayudado con cualquier problema que haya podido surgir.

Agradezco también la ayuda de mis amigos y compañeros de laboratorio, Aya y Miguel, con quienes los días han sido más entretenidos y siempre han estado dispuestos a ayudar en cualquier cosa.

Por último, agradezco y dedico la tesis a mis padres, quienes me han apoyado durante esta larga etapa y que sin ellos nada hubiera sido posible.

## Resumen

Los antibióticos han sido uno de los mayores logros de la medicina moderna y han contribuido al incremento de la esperanza de vida. Además, su uso en la producción ganadera primaria ha permitido incrementar significativamente su productividad. Sin embargo, su sobreuso ha llevado a la aparición de bacterias resistentes. Las bacterias resistentes a los antibióticos son causantes de miles de muertes anualmente, por lo que el control de las resistencias a los antibióticos y su monitorización es de suma importancia, tanto en bacterias aisladas de humanos, como en bacterias procedentes de animales de consumo y alimentos. La industria avícola representa uno de los sectores de producción primaria más importantes en España, tanto por producción como por volumen de ventas. En los productos avícolas, al igual que en otros productos alimentarios, se pueden encontrar bacterias resistentes a los antibióticos. Esto puede suponer un problema, especialmente por la posible transmisión de dichas bacterias resistentes al consumidor a través de la cadena alimentaria, ya que podrían reducir la eficacia de los tratamientos antibióticos en humanos.

Entre los antibióticos más usados, tanto en clínica humana como en uso veterinario, se encuentran los  $\beta$ -lactámicos, familia a la que pertenecen las cefalosporinas, antibióticos considerados de importancia crítica. La resistencia a estos antibióticos viene determinada en la mayoría de los casos por la acción de  $\beta$ -lactamasas, destacando las de tipo ESBL ( $\beta$ -lactamasas de amplio espectro) y las de tipo AmpC. Otro grupo de antibióticos de importancia crítica son las quinolonas, entre las que se encuentra el ciprofloxacino. Aunque para estos antibióticos el mecanismo de acción suelen ser mutaciones en las dianas de acción, se han descrito genes codificados en plásmidos transmisibles que confieren resistencia a quinolonas. Además, las bacterias que presentan algunos de los genes codificados en estos plásmidos, suelen tener asociados también genes codificantes para ESBL. Las tetraciclinas, al igual que los  $\beta$ -lactámicos, son de los primeros antibióticos usados para tratar infecciones humanas. De los diferentes mecanismos de resistencia a las tetraciclinas, los más frecuentes son la protección del ribosoma y las bombas de eflujo, que se atribuyen a la adquisición de genes de resistencia presentes en plásmidos u otros elementos genéticos móviles. Existen otros genes que confieren resistencia a diferentes familias de antibióticos. Ese es el caso de los genes que otorgan resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas tipo B (conocidos como genes MLS) y de los que los más comunes son los *erm*.

En la presente tesis nos propusimos determinar las tasas de resistencia a antibióticos de uso clínico en *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* aislados de gallinas y huevos; conocer el efecto de un tratamiento antibiótico a las aves en la selección de resistencias a antibióticos; determinar la prevalencia de algunos de los principales genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y genes de resistencia MLS, así como los cambios en las tasas de resistencia durante el crecimiento de las aves en una explotación comercial de gallinas reproductoras.

En primer lugar, se determinó la prevalencia de resistencias a los antibióticos en aislados de *E. coli* procedentes de huevos de producción convencional, ecológica y doméstica. La mayoría de las resistencias se observaron en los aislados de huevos ecológicos (56,9% del total de resistencias) seguido de los aislados de huevos domésticos (24,8% del total) y convencionales

(18,25% del total). En los 3 orígenes, la mayoría de las resistencias se observaron para la amoxicilina-clavulánico (AMC) (58,6% - 70,6%) y la tetraciclina (TE) (20% - 51,7%). Además, en el caso de los huevos ecológicos, se observaron valores importantes de resistencia a ácido nalidíxico (NA) y ciprofloxacino (CIP) (34,5%). Asimismo, fue en los aislados de provenientes de huevos ecológicos donde mayor diversidad de patrones de resistencias a antibióticos se observaron. En cuanto a genes de resistencia a antibióticos, *TEM*, *tetA* y *tetB* fueron los más frecuentemente observados en los 3 orígenes. Por último, la caracterización del riesgo indicó que el mayor riesgo viene dado por la resistencia a amoxicilina-clavulánico (para todos los orígenes) y que, atendiendo al origen de los huevos, es en los ecológicos donde más casos con una valoración de riesgo elevado existen.

También se analizaron las resistencias a antibióticos en gallinas de 1 día de vida y el efecto que un tratamiento con amoxicilina tiene sobre la selección de resistencias entre los aislados de *E. coli*. Para ello, se realizó el estudio en una granja experimental con gallinas procedentes de un criadero comercial. Las gallinas no recibieron tratamiento en el día 1. Los animales se dividieron en grupos en función de la dosis del tratamiento (dosis completa, la mitad de la dosis o un tercio de la dosis). Se recolectaron los meconios de las gallinas y muestras fecales individuales. En los aislados de meconios (gallinas de 1 día de vida) se observaron resistencias en el 63,5% de los aislados y los antibióticos con las mayores tasas de resistencia fueron NA (80%), ampicilina (AMP) y AMC (70% ambos). La elevada presencia de resistencias en aves que de 1 día de vida y que no han sido tratadas, nos sugirió que la transmisión vertical desde las gallinas progenitoras puede tener un papel importante en la transmisión de resistencias. Durante el crecimiento de las gallinas se aplicaron los diferentes tratamientos con amoxicilina y se observó que, entre los grupos con tratamiento, independientemente de la dosis, no había diferencias significativas entre ellos, pero sí con el grupo control no tratado. En las aves tratadas se observaron elevadas tasas de resistencia, no solo a AMC, sino también a AMP, cefalotina, NA y TE, indicando que el tratamiento con amoxicilina no solo seleccionó cepas resistentes a este antibiótico o familia de antibióticos, sino a otros grupos de antibióticos no relacionados con los  $\beta$ -lactámicos.

Tras los resultados obtenidos en la granja experimental, se estudió también la prevalencia de resistencias a antibióticos en explotaciones comerciales de gallinas reproductoras de la Comunidad Valenciana.

Por un lado, en una de las granjas se estudió la presencia de resistencias en las gallinas de 1 día de vida y los cambios en la prevalencia de las resistencias a medida que las gallinas crecen. En los aislados de 1 día de vida, se observaron tasas de resistencia elevadas a AMP (100%), TE (98,53%), estreptomycin (S) (66,18%) y gentamicina (57,35%), además de resistencias a cefalosporinas, principalmente a la cefotaxima (CTX) (41,18%). A medida que las gallinas crecieron, se observó una disminución generalizada en la tasa de resistencias, y tanto en pollitas como en adultas, las resistencias más frecuentemente observadas fueron a AMP y a TE, mientras que las resistencias a cefalosporinas prácticamente desaparecieron. Esta reducción pudo deberse al bajo uso de antibióticos durante el crecimiento de las gallinas, que reduce la selección de cepas resistentes. En todos los aislados de las gallinas de 1 día de vida y de los aislados resistentes o con susceptibilidad intermedia a CIP, CTX y/o ceftazidima (CAZ), se detectaron por PCR las familias de genes *CMY-2*, *SHV*, *TEM*, *qnrB* y *qnrS*. En los aislados de las

gallinas de 1 día de vida, solo se detectó el gen *CMY-2*. En el resto de aislados, *CMY-2* fue de los menos frecuentes, mientras que los más detectados fueron *SHV* y *TEM* seguidos de *qnrB* y *qnrS*.

Por otra parte, también se analizó la prevalencia de las resistencias a antibióticos en una granja de gallinas reproductoras que ya estaban en fase de producción. La mayoría de las resistencias se observaron para la AMP, la TE y el NA. Las resistencias a cefalosporinas, así como la presencia de aislados multirresistentes, fueron bajas. Entre las cepas con resistencia o susceptibilidad intermedia a CTX, CAZ y/o CIP, así como multirresistentes, se detectaron las mismas familias de genes que en el caso anterior. En esta explotación, los genes más frecuentes fueron *TEM*, *qnrS* y *qnrB*.

Por último, de forma paralela, se analizaron las resistencias a antibióticos en aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* en ambas explotaciones. Se observó también un cambio en la distribución de las especies de enterococos, pasando de aislar solo *E. faecalis* en las gallinas de 1 día de vida a ir predominando los aislados de *E. faecium* en las muestras de gallinas, tanto adultas como pollitas. En cuanto a las resistencias a antibióticos, entre los aislados de *E. faecalis* las mayores tasas de resistencias se observaron para TE y eritromicina (E), así como para CIP y C en el caso de los aislados procedentes de la explotación de gallinas adultas. En los aislados de *E. faecium*, la resistencias se observaron principalmente para TE y E, en ambas explotaciones. En ninguna de las explotaciones se aislaron cepas resistentes a vancomicina. A las cepas se les realizaron diferentes PCR para la detección de genes de resistencia en función del fenotipo. En los aislados resistentes a macrólidos y/o estreptograminas se detectaron los genes tipo MLS *ermA* y *ermB*. En el caso de los aislados resistentes a TE se detectaron los genes *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS* y *tetO*. En las cepas de *E. faecalis*, los genes con la mayor tasa de presencia fueron los MLS y los *tetM* y *tetL*. En los aislados de *E. faecium* los que mayores tasas presentaron fueron los *tetK*, *tetL*, *tetM* y el *ermB*.

Los resultados de la presente tesis muestran la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos, tanto en gallinas como en productos avícolas (huevos en este caso) y que, en el caso de huevos, estas pueden ser más diversas en huevos ecológicos que en huevos de producción convencional. También se ha visto como el tratamiento con un solo antibiótico favorece la selección de resistencias a antibióticos de distintas familias y se ha demostrado también la elevada presencia resistencias a antibióticos en *E. coli* aislados de gallinas de 1 día de vida, incluyendo resistencias a cefalosporinas. Por último, también se ha comprobado como los genes de la familia *SHV* y *TEM*, así como los *qnrB* y *qnrS* se observan con frecuencia en *E. coli* no-susceptibles a cefalosporinas o ciprofloxacino, además de la elevada frecuencia de los genes *ermB*, *tetK*, *tetL* y *tetM* en aislados de enterococos procedentes de gallinas.

## Resum

Els antibiòtics han sigut un dels majors assoliments de la medicina moderna i han contribuït a l'increment de l'esperança de vida. A més, el seu ús en la producció ramadera primària ha permès incrementar significativament la seva productivitat. No obstant això, la sobreutilització ha portat a l'aparició de bacteris resistents. Els bacteris resistents als antibiòtics són causants de milers de morts anualment, per la qual cosa el control de les resistències als antibiòtics i el seu monitoratge és de suma importància tant per a bacteris aïllats d'humans, com per a bacteris procedents d'animals de consum i aliments. La indústria avícola representa un dels sectors de producció primària més importants a Espanya, tant per producció com per volum de vendes. En els productes avícoles, igual que en altres productes alimentaris, es poden trobar bacteris resistents als antibiòtics. Açò pot suposar un problema, especialment per la possible transmissió d'aquests bacteris resistents al consumidor mitjançant la cadena alimentària, ja que podrien reduir l'eficàcia dels tractaments antibiòtics en humans.

Entre els antibiòtics més usats, tant en clínica humana com en ús veterinari, es troben els  $\beta$ -lactàmics, família a la qual pertanyen les cefalosporines, antibiòtics considerats d'importància crítica. La resistència per a aquests antibiòtics ve determinada en la majoria dels casos per l'acció de  $\beta$ -lactamases, destacant les de tipus ESBL ( $\beta$ -lactamases d'ampli espectre) i les tipus AmpC. Un altre grup d'antibiòtics d'importància crítica són les quinolones, entre les quals es troba el ciprofloxací. Encara que per a aquests antibiòtics el mecanisme d'acció solen ser mutacions en les dianes d'acció, s'han descrit gens codificats en plasmidis transmissibles i que confereixen resistència a quinolones. A més, els bacteris que presenten alguns dels gens codificats en aquests plasmidis, solen tindre associats també gens codificants per a ESBL. Les tetraciclines, igual que els  $\beta$ -lactàmics, són dels primers antibiòtics que van començar a usar-se per al tractament d'infeccions humanes. Dels diferents mecanismes de resistència a les tetraciclines, els més freqüents són la protecció del ribosoma i les bombes d'eflux, que s'atribueixen a l'adquisició de gens de resistència presents en plasmidis o altres elements genètics mòbils. Existeixen també gens que confereixen resistència a diferents famílies d'antibiòtics. Aqueix és el cas dels gens que atorguen resistència a macròlids, lincosamides i estreptogramines tipus B (coneguts com a gens MLS) i dels quals els més comuns són els *erm*.

En la present tesi ens vam proposar determinar les taxes de resistència a antibiòtics d'ús clínic en *Escherichia coli* i *Enterococcus spp.* aïllats de gallines i ous; conèixer l'efecte d'un tractament antibiòtic a les aus en la selecció de resistències antibiòtiques; determinar la prevalença d'alguns dels principals gens de resistència a  $\beta$ -lactàmics, quinolones, tetraciclines i gens de resistència MLS, així com els canvis en les taxes de resistència durant el creixement de les aus en una explotació comercial de gallines reproductores.

En primer lloc, es va determinar la prevalença de resistències als antibiòtics en aïllats d'*E. coli* procedents d'ous de producció convencional, ecològica i domèstica. La majoria de les resistències es van observar en els aïllats d'ous ecològics (56,9% del total de resistències),

seguit dels aïllats d'ous domèstics (24,8% del total) i convencionals (18,25% del total). En els 3 orígens, la majoria de les resistències es van observar per a l'amoxicilina-clavulànic (AMC) (58,6% - 70,6%) i la tetraciclina (TE) (20% - 51,7%). A més, en el cas dels ous ecològics, es van

observar valors importants de resistència a l'àcid nalidíxic (NA) i ciprofloxací (CIP) (34,5%). Així mateix, va anar en els aïllats de provinents d'ous ecològics on major diversitat de patrons de resistències a antibiòtics es van observar. Quant a gens de resistència a antibiòtics, van ser el *TEM*, el *tetA* i el *tetB* els més observats en els 3 orígens. Finalment, la caracterització del risc va indicar que el major risc ve donat per la resistència a amoxicilina-clavulànic (per a tots els orígens) i que, atés l'origen dels ous, és en els ecològics on més casos amb una valoració de risc elevat existeixen.

També es van analitzar les resistències a antibiòtics en gallines d'1 dia de vida i l'efecte que un tractament amb amoxicilina té sobre la selecció de resistències entre els aïllats d'*E. coli*. Per a això, es va realitzar l'estudi en una granja experimental amb gallines procedents d'una granja comercial. Les gallines no van rebre tractament en el dia 1. Els animals, es van dividir en grups en funció de la dosi del tractament (dosi completa, la meitat de la dosi o un terç de la dosi). Es van recol·lectar els meconis de les gallines i mostres fecals individuals. En els aïllats de meconis (gallines d'1 dia de vida), es van observar resistències en el 63,5% dels aïllats i els antibiòtics amb les majors taxes de resistència van ser NA (80%), ampilicilina (AMP) i AMC (70% en tots dos). L'elevada presència de resistències en aus d'1 dia de vida i que no han sigut tractades, ens va suggerir que la transmissió vertical des de les gallines progenitores pot tindre un paper important en la transmissió de resistències. Durant el creixement de les gallines es van aplicar els diferents tractaments amb amoxicilina i es va observar que, entre els grups amb tractament, independentment de la dosi, no hi havia diferències significatives entre ells, però sí amb el grup control no tractat. En les aus tractades, es van observar elevades taxes de resistència no sols a AMC, sinó també a AMP, cefalotina, NA i TE, indicant que el tractament amb amoxicilina no sols va seleccionar soques resistents a aquest antibiòtic o família d'antibiòtics, sinó a altres grups d'antibiòtics no relacionats amb els  $\beta$ -lactàmics.

Després dels resultats obtinguts en la granja experimental, es va estudiar també la prevalença de resistències a antibiòtics en explotacions comercials de gallines reproductores de la Comunitat Valenciana.

D'una banda, en una de les granges es va estudiar la presència de resistències en les gallines d'1 dia de vida i els canvis en la prevalença de les resistències a mesura que les gallines creixen. En els aïllats d'1 dia de vida, es van observar taxes de resistència elevades a AMP (100%), TE (98,53%), estreptomycin (S) (66,18%) i gentamicina (57,35%), a més de resistències a cefalosporines, principalment a la cefotaxima (CTX) (41,18%). A mesura que les gallines van créixer, es va observar una disminució generalitzada en la taxa de resistències, i tant en polletes com en adultes, les resistències més sovint observades van ser a AMP i a TE, mentre que les resistències a cefalosporines pràcticament van desaparèixer. Aquesta reducció pot haver-se sigut degut al baix ús d'antibiòtics durant el creixement de les gallines, que redueix la selecció de soques resistents. En tots els aïllats de les gallines d'1 dia de vida i dels aïllats resistents o amb susceptibilitat intermèdia a CIP, CTX i/o ceftazidima (CAZ), es van detectar mitjançant PCR les famílies de gens *CMY-2*, *SHV*, *TEM*, *qnrB* i *qnrS*. En els aïllats de les gallines d'1 dia de vida, només es va detectar el *CMY-2*. En la resta d'aïllats *CMY-2* va ser dels menys freqüents, mentre que els més detectats van ser *SHV* i *TEM* seguits del *qnrB* i *qnrS*.

D'altra banda, també es va analitzar la prevalença de les resistències a antibiòtics a una granja de gallines reproductores que ja estaven en fase de producció. La majoria de les resistències es van observar per a la AMP, la TE i el NA. Les resistències a cefalosporines així com la presència d'aïllats multiresistents, van ser baixos. Entre les soques amb resistència o susceptibilitat intermèdia a CTX, CAZ i/o CIP, així com multiresistents, es van detectar les mateixes famílies de gens que en el cas anterior. En aquesta explotació, els gens més freqüents van ser *TEM*, *qnrS* i *qnrB*.

Finalment, de manera paral·lela, es van analitzar les resistències a antibiòtics en aïllats de *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* en totes dues explotacions. A més, es va observar també un canvi en la distribució de les espècies d'enterococs, passant d'aïllar només *E. faecalis* en les gallines d'1 dia de vida a anar predominant els aïllats de *E. faecium* en les mostres de gallines, tant adultes com en polletes. Quant a les resistències a antibiòtics, entre els aïllats de *E. faecalis* les majors taxes de resistències es van observar per a TE i eritromicina (E), així com per a CIP i C en el cas dels aïllats procedents de l'explotació de gallines adultes. En els aïllats de *E. faecium*, la resistències es van observar principalment per a TE i E en totes dues explotacions. En cap de les explotacions es van aïllar ceps resistents a vancomicina. A les soques se'ls van realitzar diferents PCR per a la detecció de gens de resistència en funció del fenotip. En els aïllats resistents a macròlids i/o estreptogramines, es van detectar els gens tipus MLS *ermA* i *ermB*. En el cas dels aïllats resistents a TE es van detectar els gens *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS* i *tetO*. En els ceps de *E. faecalis*, els gens amb la major taxa de presència van ser els MLS i els *tetM* i *tetL*. En els aïllats de *E. faecium* els que majors taxes van presentar van ser els *tetK*, *tetL*, *tetM* i el *ermB*.

Els resultats de la present tesi mostren la presència de bacteris resistents als antibiòtics tant en gallines com en productes avícoles (ous en aquest cas) i que, en el cas d'ous, aquestes poden ser més diverses en ous ecològics que en ous de producció convencional. També s'ha vist com el tractament amb un sol antibiòtic afavoreix la selecció de resistències a antibiòtics de diferents famílies i s'ha demostrat també l'elevada presència resistències a antibiòtics en *E. coli* aïllats de gallines d'1 dia de vida, incloent resistències a cefalosporines. Per últim, també s'ha comprovat com els gens de les famílies *SHV* i *TEM*, així com els *qnrB* i *qnrS* s'observen amb freqüència en *E. coli* no-susceptibles a cefalosporines o ciprofloxací, a més de l'elevada freqüència dels gens *ermB*, *tetK*, *tetL* i *tetM* en aïllats d'enterococs procedents de gallines.

## Abstract

Antibiotics have been one of the most important achievements in modern medicine and have contributed to life expectancy increasing. Furthermore, its use in livestock production has led to a significant raise in productivity. However, its overuse has caused the apparition of resistant bacteria. Antibiotic resistant bacteria cause thousands of deaths annually, so the control of antibiotic resistance and their monitoring is of utmost importance for bacteria isolated from humans as well as bacteria isolated from food and food-animals. Poultry farming is one of the most important sectors of primary production in Spain for both production volume and sales. Poultry products, as for any other food product, antibiotic resistant bacteria can be found. These may pose a risk, especially for the possible transmission of the resistant bacteria to consumers via the food chain, since these resistant bacteria could reduce the efficacy of antibiotic treatments in humans.

Among the antibiotics most used, both in human clinical practice and veterinary medicine, are the  $\beta$ -lactams, family to which the cephalosporins belong, antibiotics considered as of critical importance. Resistance to this family is determined in many cases by  $\beta$ -lactamases, highlighting ESBL (Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases) and AmpC types. Another family of critically important antibiotics are the quinolones, among which is ciprofloxacin. Even though for these antibiotics the main resistance mechanism are mutations in the action targets, genes conferring resistance to quinolones coded in transmissible plasmids have been described. Also, bacteria carrying some of these plasmids encoded genes usually present ESBL genes. Tetracyclines, like  $\beta$ -lactams, are among the first used antibiotics to treat human infections. Of the different tetracycline resistance mechanisms, the most frequent are the ribosome protection and efflux pumps and are usually attributed to the acquisition of resistance genes carried in plasmids or other mobile genetic elements. Genes conferring resistance to different antibiotics families at once also exist. This is the case of genes that confer resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins B (known as MLS genes) and of which the most common are the *erm* genes.

In this thesis we set out to determine the rates of antibiotic resistance against clinically used antibiotics in *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* isolates from hens and eggs; to know the effect of an antibiotic treatment on the birds in the selection of antibiotic resistance; to determine the prevalence of some of the main resistance genes for  $\beta$ -lactams, quinolones, tetracyclines and MLS resistance genes, as well as to determine the changes in the antibiotic resistance rates during the rearing of the chicks in a commercial farm of breeding hens.

Firstly, the antibiotic resistance prevalence was determined in *E. coli* isolated from eggs coming from conventional, organic and backyard production. Most of the resistances were observed in the isolates from organic eggs (59.9% of total resistance), followed by backyard eggs isolates (24.8% of the total) and conventional eggs isolates (18.25% of the total). In all 3 origins, resistance was observed mainly for amoxicillin-clavulanic acid (AMC) (58.6%-70.6%) and tetracycline (TE) (20%-51.7%). What is more, in organic eggs, important values of resistance against nalidixic acid (NA) and ciprofloxacin (CIP) were observed (34.5%). Likewise, more patterns of antibiotic resistance were observed in isolates from organic eggs. Regarding the antibiotic resistance genes, *TEM*, *tetA* and *tetB* were the most observed in all 3 origins.

Finally, the risk characterization indicated that the greater risk comes from resistance to amoxicillin-clavulanic acid (for all the origins) and that, in relation to the egg's origin, it is in organic eggs where more cases with a high risk value existed.

Antibiotic resistance in one-day old chicks and the effect that an amoxicillin treatment has in the selection of resistances in *E. coli* isolates were also analyzed. For this, the experiment was carried out on an experimental farm with hens purchased from a commercial breeding farm. The chicks did not receive any treatment on the first day. The birds were divided into groups depending on the antibiotic dose they would receive (complete dose, half of the dose and one third of the dose). Meconium and individual fecal samples were taken. In the meconium isolates (one-day old chicks), antibiotic resistances were observed in 63.5% of the isolates and the antibiotic with the highest resistance rates were NA (80%), ampicillin (AMP) and AMC (70% both). The high prevalence of resistance among untreated one-day old chicks, suggested to us that vertical transmission from hens may have an important role in resistance transmission. During the growth of the hens, different amoxicillin treatments were applied, and it was observed that, among the treated groups, with independence from dose, no significant differences were present, but there were with the untreated control group. In the treated birds, high resistance rates were observed, not only for AMC but also for AMP, cephalothin, NA and TE, indicating that the amoxicillin treatment not only selected resistant strains to this antibiotic or this antibiotic family, but also other antibiotic groups unrelated to  $\beta$ -lactams.

After the results obtained in the experimental farm, the prevalence of antibiotic resistances in commercial farms of the Valencian Community were also studied.

On the one hand, in one of the farms it was studied the presence of antibiotic resistance in one-day old chicks and the changes in the prevalence of the resistance as hens grew. In isolates from one-day old chicks, high resistance rates were observed for AMP (100%), TE (98.53%), streptomycin (S) (66.18%) and gentamycin (57.35%), as well as resistance to cephalosporins, mainly cefotaxime (CTX) (41.18%). As hens grew, a generalized decrease in antibiotic resistance was observed, and in pullets and adult hens the most frequently observed resistance was to AMP and TE, whilst cephalosporin resistances practically disappeared. This reduction may be due to the low usage of antibiotics during the rearing of hens, that could have reduced the selection of resistant strains. In all one-day old chicks isolates and all isolates with resistance or intermediate susceptibility to CIP, CTX and/or ceftazidime (CAZ), family genes *CMY-2*, *SHV*, *TEM*, *qnrS* and *qnrB* were detected by PCR. In one-day old chick isolates, only *CMY-2* was detected. For the rest of the isolates *CMY-2* was among the least frequently detected genes, while *SHV* and *TEM* were the most detected genes followed by *qnrB* and *qnrS*.

On the other hand, the prevalence of antibiotic resistance in a hen farm during production stage was also analyzed. Most observed resistances were for AMP, TE and NA. Cephalosporin resistance, as well as multi-resistant isolates, were low. For the isolates with resistance or intermediate susceptibility to CIP, CTX and/or CAZ and for all the multi-resistant isolates, the same family of genes as before were detected. In this farm, the most observed genes were *TEM*, *qnrS* and *qnrB*.

Finally, in parallel, antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* were analyzed in both farms. Moreover, a change in the distribution of the enterococcus

species was observed, coming from isolating only *E. faecalis* in one-day old chicks to the predominance of *E. faecium* in pullets and adult hens. For the antibiotic resistances, among the *E. faecalis* isolates the highest rates of resistance were observed for TE and erythromycin (E), and for CIP and C in isolates from the farm of adult hens. In *E. faecium*, resistances were mainly observed for TE and E in both farms. Resistance to Vancomycin was not observed in any of the farms. Different PCRs for the detection of antibiotic resistance genes were made depending on the resistance phenotype. In macrolide and/or streptogramins resistant isolates, the MLS genes *ermA* and *ermB* were detected. For the TE resistant isolates, the genes *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* and *tetS* were detected. In *E. faecalis* isolates, the most frequently detected genes were the MLS and *tetM* and *tetL*. In *E. faecium* isolates, the ones with the highest rates were *tetK*, *tetL*, *tetM* and *ermB*.

The results of the present thesis show the presence of antibiotic resistance bacteria both in poultry and in poultry products (eggs in this case) and, that in eggs, the resistances can be more diverse in organic eggs than in conventional. It has been seen too how the treatment with one antibiotic can favour the selection of antibiotic resistances to different families and, also, the presence of antibiotic resistant *E. coli* in one-day old chicks has been proven too, including resistance to cephalosporins. Likewise, it has been proven how the genes of the *SHV* and *TEM* families, as well as *qnrB* and *qnrS* genes are frequently observed in cephalosporins or ciprofloxacin non-susceptible *E. coli*, apart from the high prevalence of *ermB*, *tetK*, *tetL* and *tetM* genes in enterococcus isolates from hens.

## Índice

1.	Introducción .....	1
1.1.	Avicultura .....	1
1.1.1.	Importancia económica del sector .....	1
1.1.2.	Sistemas de producción avícola .....	1
1.2.	Resistencias a antibióticos y sistemas de monitorización.....	2
1.3.	Transmisión de resistencias a antibióticos. Mecanismos y genes de resistencia.....	4
1.3.1.	Resistencia a $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas. ....	6
1.3.2.	Resistencia a quinolonas .....	8
1.3.3.	Resistencias a tetraciclinas.....	9
1.3.4.	Resistencias a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS <sub>B</sub> ).....	10
1.4.	<i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus spp.</i> como organismos indicadores de resistencias a antibióticos.....	10
1.4.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	10
1.4.2.	<i>Enterococcus</i> .....	11
1.5.	Co-selección de resistencias a antibióticos .....	11
1.6.	Resistencias a los antibióticos en animales de consumo y alimentos derivados.....	12
2.	Objetivos .....	15
3.	Capítulo 1. Caracterización del riesgo de la resistencia a antibióticos en bacterias potencialmente peligrosas para la salud humana aisladas de huevos ecológicos, domésticos y convencionales.....	17
3.1.	Materiales y métodos .....	17
3.1.1.	Muestreo de los huevos .....	17
3.1.2.	Aislamiento de <i>Salmonella spp.</i> .....	17
3.1.3.	Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> .....	18
3.1.4.	Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
3.1.5.	Determinación de la sensibilidad antimicrobiana.....	18
3.1.6.	Extracción del DNA.....	19
3.1.7.	Detección de los genes de resistencia a antimicrobianos mediante PCR múltiple (mPCR)	19
3.1.8.	Caracterización del riesgo .....	20
3.1.9.	Análisis estadístico .....	21
3.2.	Resultados y discusión .....	21
3.2.1.	Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp.</i> y <i>E. coli</i> .....	21
3.2.2.	Resistencia a antibióticos .....	22

---

3.2.3.	Multirresistencia antimicrobiana .....	26
3.2.4.	Genes de resistencia a antibióticos.....	27
3.2.5.	Caracterización del riesgo .....	30
4.	Capítulo 2. Resistencia a antibióticos en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de gallinas de un día de vida y efecto de un tratamiento de amoxicilina durante su crecimiento .....	32
4.1.	Materiales y métodos .....	32
4.1.1.	Cría de las gallinas .....	32
4.1.2.	Administración del antibiótico .....	32
4.1.3.	Recolección de las muestras .....	33
4.1.4.	Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> .....	33
4.1.5.	Test de sensibilidad antimicrobiana.....	33
4.1.6.	Análisis estadístico .....	33
4.2.	Resultados y discusión .....	34
4.2.1.	Resistencias en gallinas de un día de vida.....	34
4.2.2.	Cambios en los patrones de resistencia durante los tratamientos experimentales con amoxicilina.....	35
5.	Capítulo 3. Estudio de las resistencias a antibióticos en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de gallinas reproductoras en granjas avícolas .....	39
5.1.	Prevalencia de resistencias a antibióticos y de algunos de los principales genes asociados a la resistencia a cefalosporinas y quinolonas durante el crecimiento de gallinas reproductoras.....	39
5.1.1.	Materiales y métodos.....	39
5.1.2.	Resultados y discusión .....	43
5.2.	Prevalencia de resistencias a antibióticos y de algunos de los principales genes de resistencia a cefalosporinas y quinolonas en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de una granja de gallinas reproductoras durante la fase de producción .....	59
5.2.1.	Materiales y métodos.....	59
5.2.2.	Resultados y discusión .....	59
6.	Capítulo 4. Resistencias a antibióticos en <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> aislados de dos granjas de gallinas reproductoras .....	68
6.1.	Materiales y métodos .....	68
6.1.1.	Protocolo de muestreo .....	68
6.1.2.	Aislamiento e identificación de cepas de <i>Enterococcus spp.</i> .....	68
6.1.3.	Antibiogramas .....	69
6.1.4.	Extracción de DNA.....	69
6.1.5.	PCRs para la detección de genes de resistencia antibiótica .....	69

6.1.6.	Análisis estadístico .....	70
6.2.	Resultados y discusión .....	71
6.2.1.	Identificación de las cepas de <i>Enterococcus spp.</i> .....	71
6.2.2.	Prevalencia de resistencias a antibióticos.....	72
6.2.3.	Perfiles de resistencias a antibióticos .....	76
6.2.4.	Genes de resistencia a antibióticos.....	79
7.	Conclusiones.....	85
	Bibliografía .....	87
	Anexos.....	108
	Anexo I. Abreviaturas usadas.....	108

## Índice de tablas

Tabla 1.	Secuencia, concentración usada e iniciadores usados.....	19
Tabla 2.	Multirresistencias en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de huevos con diferentes sistemas de producción. ....	26
Tabla 3.	Presencia de genes de resistencia observados en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de huevos procedentes de cada uno de los sistemas de producción .....	28
Tabla 4.	Caracterización del riesgo de las resistencias a antimicrobianos de cepas de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> aisladas de huevos domésticos, ecológicos y convencionales. “Sin riesgo adicional”: valor = 0; “Algo de riesgo adicional”: valor entre 1-6; “Elevado riesgo adicional”: valor entre 7-12; “Riesgo adicional muy elevado”: valor entre 13-18.....	30
Tabla 5.	Porcentaje de <i>E. coli</i> resistente (R), intermedio (I) y sensible (Sn).....	37
Tabla 6.	Muestreos, edad de las aves, tipo de muestra por muestreo y tratamientos aplicados a las gallinas. ....	40
Tabla 7.	Iniciadores usados para la detección de genes de resistencia en <i>Escherichia coli</i> . ....	42
Tabla 8.	Prevalencia de resistencias en cepas de <i>E. coli</i> para los distintos orígenes. N (total de cepas para el origen); n (número de cepas resistentes). a diferencias significativa entre pollitas y adultas en heces; b diferencias significativa entre pollitas y adultas en calzas; c diferencias significativa entre 1 día de vida y pollitas; d diferencias significativa en pollitas entre heces y calzas; e diferencias significativas en adultas entre heces y calzas .....	43
Tabla 9	Distribución del número de resistencias albergadas por cepa en cepas aisladas de <i>E. coli</i> aisladas de meconios, heces y calzas. N (total de cepas para el origen); n (total de cepas en el muestreo).....	51

Tabla 10 Perfiles de resistencias observados en las cepas de E. coli aisladas de meconios. N=68 .....	52
Tabla 11. Perfiles de resistencias observados en las cepas de E. coli aisladas de heces y calzas. .....	53
Tabla 12. Prevalencia de los genes de resistencia testados mediante PCR. N = número total de cepas; n = número de cepas.....	55
Tabla 13. Prevalencia de los perfiles de genes de resistencia antibiótica observados en las cepas de E. coli aisladas de meconios, heces y calzas. N = número total de cepas; n = número de cepas .....	58
Tabla 14. Prevalencia de resistencias en cepas de E. coli para los distintos orígenes. N= número total de cepas en cada origen. Entre paréntesis está el número de cepas resistentes por antibiótico. a diferencia significativa entre heces y calzas. ....	60
Tabla 15. Prevalencia de los perfiles de resistencia a antibióticos observados en cada origen. Entre paréntesis se indica el número de cepas observadas para cada perfil. Número total de cepas en heces: 320. Número total de cepas en calzas: 256. ....	64
Tabla 16. Prevalencia de los genes de resistencia a antibióticos testados por PCR. Entre paréntesis se indica el número de cepas. En el origen se indica entre paréntesis el número total de cepas testadas para las muestras de heces y de calzas. a indica diferencia significativa entre los resultados obtenidos en cada origen. ....	64
Tabla 17. Prevalencia de los perfiles de genes de resistencia antibiótica observados en las cepas de E. coli aisladas de heces y calzas. N = número total de cepas; entre paréntesis se indica el número de cepas. ....	67
Tabla 18. Iniciadores usados para la identificación de la especie en las cepas de enterococos. 68	
Tabla 19. Iniciadores usados para la detección de los genes de resistencia antibiótica a MLS y tetraciclinas. ....	70
Tabla 20. Distribución de la especie de las cepas de Enterococcus spp. aisladas de gallinas reproductoras en función de la edad de las gallinas. Entre paréntesis se indica el número de cepas. ....	71
Tabla 21. Distribución del número de resistencias por cepa en E. faecalis y E. faecium aislados de gallinas del lote A y del lote B. Entre paréntesis se indica el número de cepas. ....	77
Tabla 22. Perfiles de resistencias observados entre las cepas de E. faecalis y E. faecium aisladas tanto del lote A como del lote B (no se han tenido en cuenta las cepas sin resistencias). Entre paréntesis se indican el número de cepas. ....	78
Tabla 23. Perfiles de genes de resistencia observados en función de las PCR realizadas a las cepas de E. faecalis aisladas de las gallinas de los lotes A y B. Entre paréntesis se indica en número de cepas.....	82

Tabla 24. Perfiles de genes de resistencia observados en función de las PCR realizadas a las cepas de *E. faecium* aisladas de las gallinas de los lotes A y B. Entre paréntesis se indica en número de cepas..... 83

## Índice de figuras

Figura 1. Análisis de Correspondencia Múltiple entre las cepas de *E. coli* aisladas y la respuesta al antibiograma (R.S=sensible; R.R= resistente; R.I= intermedio), considerando el estilo de producción (C.S= Convencional; C.B= Doméstico; C.O= Ecológico). ..... 23

Figura 2. Perfiles de sensibilidad a los 12 antibióticos testados en el estudio en los 3 sistemas de producción de huevos. Azul =resistente; Rojo = intermedia; Verde = sensible..... 24

Figura 3. Porcentaje de *E. coli* resistente (azul), intermedio (rojo) y sensible (verde) aisladas de los meconios..... 34

Figura 4. MCA bi-plot. Antibióticos testados: A.KF = cefalotina; A.AMC = amoxicilina-clavulánico; A.AMP = ampicilina; A.NA = ácido nalidíxico; A.TE = tetraciclina; A.S = estreptomina; A.K = kanamicina; A.CIP = ciprofloxacino; A.C = cloranfenicol; A.CN = gentamicina; A.CRO = ceftriaxona; A.AK = amikacina. Antes de la administración de cualquier dosis (T.CO), después de la administración de las tres dosis (T.T1, T.T2 y T.T3), y para el mismo muestreo en el grupo control (T.C1, T.C2, T.C3). RV= (valores resistentes), I.V=(valores intermedios), S.V=(valores sensibles). ..... 36

Figura 5. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas de heces por edad de las gallinas. La línea de puntos discontinua es la línea de tendencia..... 47

Figura 6. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas de calzas por edad de las gallinas..... 48

Figura 7. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (naranja) por edad de las gallinas. .... 50

Figura 8. Prevalencia de multirresistencias (MR) en cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (naranja)..... 54

Figura 9. Número de genes albergados por las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (rojo)..... 57

Figura 10. Prevalencia del número de resistencias a antibióticos observadas en las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (rojo). ..... 62

Figura 11. Prevalencia del número de genes de resistencia antibiótica observados en las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (rojo). El número total de cepas testadas fue: 60 cepas para las heces y 61 cepas para las calzas. .... 66

Figura 12. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos testados en las cepas de *E. faecalis* aisladas de las gallinas del lote A (azul) y del lote B (rojo)..... 73

Figura 13. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos testados en las cepas de *E. faecium* aisladas de las gallinas del lote A (azul) y del lote B (rojo). ..... 73

Figura 14. Prevalencia de los diferentes genes de resistencia a antibióticos detectados en las cepas de *E. faecalis*. En azul están representados los porcentajes de cepas positivas para el lote A y en rojo los del lote B..... 80

Figura 15. Prevalencia de los diferentes genes de resistencia a antibióticos detectados en las cepas de *E. faecium*. En azul están representados los porcentajes de cepas positivas para el lote A y en rojo los del lote B. .... 81

# 1. Introducción

## 1.1. Avicultura

### 1.1.1. Importancia económica del sector

El sector avícola es, dentro de los sectores de la producción primaria, uno de los más importantes en España, con un gran volumen de ventas, tanto dentro del propio mercado interno como en ventas al exterior, incluyendo países de la Unión Europea y terceros países. Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018) el sector avícola ha tenido un desarrollo importante durante las últimas décadas. En 2018 España ocupó el tercer lugar entre los países de la Unión Europea (UE) en producción de huevos (Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2019) y fue el 2º productor europeo de carne de pollo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019a). Aparte de la importancia en España, también a nivel mundial es un sector al alza, en especial el de la carne de pollo, donde se observan continuados crecimientos anuales de la producción (Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2019).

Además de la relevancia económica nacional, también cabe destacar la importancia de los productos avícolas para el consumidor. Según informa el MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019b) la carne de ave es la más consumida entre las carnes en fresco y la segunda en el total de carnes. Además, los huevos se consideran un producto básico de la cesta de la compra de los españoles y su consumo, estimado en 137 Kg por habitante y año, se mantiene estable anualmente (Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2016).

### 1.1.2. Sistemas de producción avícola

Dentro del sector avícola hay diferentes tipos de producción, en función del objetivo para el que se destinarán los animales. Así, tenemos la avicultura de carne (pollos de engorde), avicultura de puesta (gallinas ponedoras) y la cría de aves para reemplazo, tanto de pollos de engorde como de ponedoras (gallinas reproductoras).

La industria avícola actual se basa en un sistema de estructura piramidal, donde las aves de la base son las usadas en la producción de carne y huevos, mientras que las situadas en los niveles superiores son las poblaciones que se dedican al mantenimiento y cría. Así, las gallinas de pedigrí y los “Great Grandparents stocks” se encuentran en lo más alto de la pirámide y, a través de la cría, se obtienen el “Grandparent stock” y el “Parent stock”, de los cuales se obtienen las gallinas y pollos de engorde de la base de la pirámide (Dierikx *et al.*, 2013).

Existen diferentes estirpes de gallinas y pollos, que se han desarrollado seleccionando las características más adecuadas en función del tipo de explotación para el que se destinarán, ya sea la producción de carne o huevos. Las empresas encargadas de hacer los cruces y mantener las líneas se conocen como “criadores primarios”. En la actualidad, tan solo hay un puñado de criadores primarios de gallinas ponedoras, pollos de engorde, pavos y patos. Esto ha permitido que cada criador primario pueda mantener más líneas de selección y probarlas bajo diferentes condiciones comerciales. Además, el entrecruzamiento sistémico de líneas especializadas en producción de carne o huevos ha permitido a los criadores primarios, mediante una selección intensiva, obtener tasas de progreso predecibles sin los efectos indeseados de la endogamia (Flock & Preisinger, 2007).

En cuanto al sector de la avicultura de puesta, existen diferentes sistemas de producción basados en la forma de cría de las aves. Así, podemos encontrar huevos de aves criadas en jaula, en suelo, camperas y ecológicas. La forma de cría se debe indicar en el huevo, siguiendo la codificación establecida en el Real Decreto 226/2008 (España, 2008), que indica que los huevos tendrán una etiquetación diferenciada en la que se determine el sistema de cría, el país de origen y la granja de producción. Aparte de los sistemas indicados anteriormente, también podemos encontrar las aves criadas domésticamente, aunque los productos de estas se destinan principalmente al autoconsumo.

En el caso de las aves ecológicas, para obtener esta consideración han de cumplir ciertos requisitos que los diferencian de los producidos obtenidos mediante sistemas convencionales. Estos vienen marcados en el Reglamento Europeo 2018/848 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2018). Un ejemplo es el caso de los tratamientos veterinarios, donde no se permite el uso preventivo de medicamentos alopáticos de síntesis química ni de antibióticos, y en caso de que el animal necesitare de tratamiento, este debe limitarse al mínimo necesario para la recuperación del animal.

### 1.2. Resistencias a antibióticos y sistemas de monitorización

Los antibióticos han sido uno de los mayores logros de la medicina y han contribuido al incremento de la esperanza de vida humana. Han posibilitado el tratamiento de enfermedades infecciosas y han reducido complicaciones como las infecciones de heridas. Además de todo esto, también tienen una importante función profiláctica, usándose en muchos casos para la prevención de infecciones bacterianas tras ciertas intervenciones quirúrgicas. Los antibióticos no solo son importantes en medicina humana, sino que también lo son para la medicina veterinaria, donde se usan con diferentes objetivos, como tratar enfermedades infecciosas causadas por bacterias, promover el crecimiento de los animales mediante la administración de antibióticos a nivel subterapéutico, incrementar la eficacia en la conversión de alimento y prevenir enfermedades (Hong *et al.*, 2013; Hao *et al.*, 2014; You & Silbergeld, 2014; Manyi-Loh *et al.*, 2018), e incluso en ocasiones se administran tratamientos a animales sanos cuando se manifiestan signos clínicos en un animal (Woolhouse *et al.*, 2015). El uso en animales varía en función de los países. Por ejemplo, en el caso de la Unión Europea, su uso como promotores del crecimiento está prohibido desde el año 2006 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2003). Aunque la introducción de los antibióticos en la práctica avícola ha permitido

mejorar el rendimiento de las granjas y la producción de alimentos, también ha supuesto un gran incremento en el consumo global de antibióticos y, con ello, un aumento de las probabilidades de seleccionar poblaciones bacterianas resistentes a los mismos.

La resistencia a los antibióticos es la capacidad que tienen algunas bacterias para evitar el efecto de los antibióticos. Desde los primeros momentos del uso de antibióticos se empezaron a observar resistencias. En 1940, el mismo año en el que se empezaron a hacer ensayos clínicos con penicilinas, se observó en *Escherichia coli* una penicilinasasa que otorgaba resistencia a estas (Abraham & Chain, 1940). Desde entonces, y hasta la actualidad, se han ido detectando nuevos tipos de mecanismos de resistencias.

Debido a las propias mutaciones de los organismos, así como a la transmisión horizontal de genes de resistencias y al incremento del uso de los antibióticos, se han ido desarrollando, seleccionando y expandiendo cepas resistentes a los diferentes antibióticos. Todo esto ha contribuido a reducir la efectividad de los tratamientos. De hecho, según el “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) (2019), la resistencia a los antibióticos es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, ya que está causando que enfermedades que una vez fueron fácilmente tratables, se hayan vuelto más difíciles y caras de tratar. Además, según datos de la Comisión Europea (2017), actualmente se estima que las bacterias resistentes a los antimicrobianos son responsables de la muerte de 25.000 personas al año en la Unión Europea (UE).

Todo esto convierte a las bacterias resistentes en un grave problema de salud pública, y hace imprescindible mantener bajo control las resistencias, mediante una correcta gestión del uso de los antibióticos, con el fin de evitar la dispersión e incremento de las bacterias resistentes, en la medida de lo posible.

Con el fin de controlar la expansión de las bacterias resistentes a los antibióticos y para conocer la distribución, prevalencia y cambios temporales de las resistencias a antibióticos, son necesarios estudios de vigilancia o monitorización. Estos estudios permiten obtener información sobre la distribución y los cambios en la tendencia de la tasa de resistencias en el tiempo. Además, la información que aportan es útil para la elaboración de planes de reducción de las resistencias, así como para determinar la eficacia de las medidas adoptadas.

Actualmente se encuentran en activo diferentes sistemas de vigilancia para controlar y conocer la dispersión de resistencias a antibióticos y dar a conocer la problemática de las resistencias, además de asesorar a los legisladores para establecer acciones encaminadas a solucionar los problemas relacionados con estas. Además, estos sistemas, al ofrecer metodologías armonizadas, permiten la comparación de resultados entre los diferentes países europeos. Uno de los programas existentes en la UE es el “European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)” (ECDC, s.f.), en el que se vigila la presencia de resistencias en bacterias procedentes de muestras clínicas invasivas.

Además de los programas centrados en cepas clínicas, también hay en marcha programas de monitorización cuyo objetivo es averiguar si las resistencias observadas en infecciones humanas se originaron en animales y luego se transmitieron a humanos (Frye & Jackson, 2013). Estos estudios están enfocados a determinar la presencia de resistencias en cepas

procedentes de muestras de animales de consumo, humanos y alimentos. En Europa, la “European Food Safety Authority” (EFSA) junto con el “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC) publican anualmente un informe sobre la prevalencia y la tendencia de las resistencias a antibióticos en bacterias zoonóticas e indicadoras en animales, humanos y alimentos (ECDC, 2019).

Este tipo de sistemas también se encuentra a nivel individual en diferentes países de la UE, como Dinamarca, donde se tienen en marcha un sistema para el control de resistencias en aislados de animales de consumo, alimentos y humanos, denominado DANMAP (Statens Serum Institut, s.f.). Fuera de la UE también encontramos sistemas de este tipo, como en Estados Unidos, donde el sistema de vigilancia “National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria” (NARMS), que está en marcha desde 1996, se encarga de la monitorización de resistencias en bacterias entéricas procedentes de humanos, carnes y animales de consumo (CDC, 2019).

Sin embargo, las resistencias a antibióticos están presentes en niveles muy preocupantes en nuestro entorno. Según el EARS-Net (ECDC, 2018b), a pesar de la priorización política y la gestión en el uso de antibióticos basado en la evidencia científica, dentro de la UE y el espacio económico europeo los niveles de resistencias a antibióticos siguen siendo elevados, en especial para ciertos antibióticos y determinadas especies. Por ejemplo, en el caso de *Escherichia coli*, tanto la presencia de resistencias a varios antibióticos, así como la presencia de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBL por sus siglas en inglés) es frecuente (ECDC, 2018b).

### 1.3. Transmisión de resistencias a antibióticos. Mecanismos y genes de resistencia.

El efecto bactericida o bacteriostático de los antibióticos se produce como consecuencia del bloqueo de procesos o rutas metabólicas vitales para las bacterias. No obstante, algunas bacterias son capaces de evitar los efectos negativos de los antibióticos, haciendo que su uso sea ineficaz.

Hay que tener en cuenta que algunas bacterias no son sensibles a ciertos antibióticos por sus propias características estructurales. Son las denominadas “resistencias intrínsecas”. Por ejemplo *E. coli* es resistente a los macrólidos, no por la presencia de mecanismos de resistencias específica, sino porque la estructura de su membrana externa impide que los macrólidos lleguen en cantidad suficiente a los ribosomas, que sí son sensibles al efecto del antibiótico. En estos casos no se puede hablar de resistencia a antibióticos como tal (Baquero & Cantón, 2017).

Las resistencias a antibióticos se desarrollan, bien por la aparición de mutaciones cromosómicas que siguen una línea darwiniana (Sykes, 2010), o bien por la incorporación de genes de resistencias transmitidos de unas bacterias a otras por elementos genéticos móviles mediante transferencia horizontal (Van den Bogaard *et al.*, 2001; Binnewies *et al.*, 2006, Cantón & Morosini, 2011).

La mayoría de los genes de resistencia, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, se encuentran en plásmidos. Estos plásmidos son grandes, autoconjugantes y controlan su número de copias mediante la regulación de la tasa de replicación en la célula (Nordstrom, 2005), lo que puede conducir a su expansión y permanencia en la comunidad microbiana, proporcionando una ventaja evolutiva para las cepas portadoras. Además, los genes de resistencia presentes en plásmidos suelen estar asociados en elementos genéticos móviles, como secuencias de inserción, transposones simples o complejos e integrones. Esta asociación les otorga ventajas en su difusión, ya que, si el plásmido en el que se encuentran no puede replicarse en la bacteria hospedadora, tiene la posibilidad de incorporarse a otro plásmido o al cromosoma bacteriano (Roy & Partridge, 2017). En cuanto al papel de los elementos genéticos móviles, durante los últimos años se ha visto como algunas secuencias de inserción, como la IS26 y la ISCR1, tienen un papel importante en la movilización y expresión de los genes de resistencia (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011). Se sabe que IS26 media en la movilización de los genes SHV que codifican para ESBL (Baquero & Cantón, 2017) además de estar frecuentemente asociada, al igual que ISCR1, a genes *qnr* que codifican para resistencia a quinolonas (Hooper & Jacoby, 2015). Aparte de las secuencias de inserción, en el caso de las bacterias Gram negativas también son importantes los integrones (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011), estructuras genéticas heredables con capacidad para integrar diversos genes de resistencia en lo que ese conoce como casetes (Cambray *et al.*, 2010).

Las resistencias a antibióticos pueden deberse a cambios en la diana de acción de los antibióticos, a la modificación del antibiótico, a una reducción en la incorporación del antibiótico o a la expulsión del antibiótico mediante bombas de eflujo.

De entre todas las formas de resistencia antibiótica, la alteración de las dianas de acción es el método más común y diverso. En algunos casos, estas modificaciones consisten en mutaciones puntuales en los genes que codifican para la proteína diana. En otros casos, las bacterias incorporan nuevos genes que codifican para sustitutos de la diana capaces de realizar la misma función, y que no son sensibles a la acción del antibiótico. También se dan casos en los que se adquieren nuevas rutas metabólicas. Finalmente, en ocasiones se producen proteínas capaces de interactuar con la diana, de tal forma que la protegen de la acción del antibiótico (Valdivia & Rice, 2017).

En cuanto a la modificación del antibiótico como mecanismo de resistencia, las bacterias alteran su estructura mediante el uso de enzimas específicas, eliminando así la capacidad de este de actuar frente a su diana de acción. Este mecanismo es el que se da por ejemplo en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos por acción de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBL por sus siglas en inglés). Un factor interesante a tener en cuenta respecto a la resistencia por alteración enzimática del antibiótico es que, a diferencia de otros mecanismos, puede reducir la concentración de moléculas activas de antibiótico en el ambiente cercano a las bacterias resistentes, lo que, a su vez, teóricamente, puede permitir el crecimiento de las bacterias sensibles cercanas. Así, las causantes de la infección fuesen bacterias sensibles, el tratamiento antibiótico podría no tener el efecto esperado (D'Costa & Wright, 2017).

Por otra parte, la reducción en la incorporación de antibiótico por parte de las bacterias puede deberse a limitaciones en la permeabilidad de la membrana o a la presencia de bombas de

eflujo. La membrana externa de las bacterias Gram negativas no permite la entrada de moléculas superiores a un tamaño determinado, lo que dificulta la entrada a la célula de antibióticos grandes. Es esta restricción en la permeabilidad de la membrana externa la que hace que las bacterias Gram negativas sean intrínsecamente resistentes a un mayor número de antibióticos que las bacterias Gram positivas (Fernández *et al.*, 2017).

Otra forma de reducir la incorporación o concentración de antibiótico en el interior celular es mediante la acción de bombas de eflujo activo. Las bombas de eflujo ejercen funciones fisiológicas para la bacteria y las resistencias suelen aparecer cuando se producen mutaciones o se adquieren genes que incrementan la expresión de estos sistemas de eflujo (Fernández *et al.*, 2017). Se sabe que hay bombas capaces de expulsar un amplio rango de moléculas sin relación entre ellas, como antibióticos, biocidas, metales pesados detergentes, disolventes orgánicos o tintes (Poole, 2004). Hasta el momento se han descrito muchas bombas de eflujo diferentes. Algunas de estas bombas otorgan resistencias específicas, mientras que otras pueden otorgar multirresistencias (Li, 2017).

### 1.3.1. Resistencia a $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas.

Los  $\beta$ -lactámicos son uno de los grupos de antibióticos más usados en la actualidad, y los primeros en usarse. Su uso en clínica empezó en la década de 1940 en 10 pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* (Abraham *et al.*, 1992). Desde entonces se han obtenido numerosas variantes de los compuestos iniciales, tanto naturales como semisintéticos, lo que ha permitido obtener fármacos más eficaces.

La actividad antibacteriana de los  $\beta$ -lactámicos se debe a la reacción entre el anillo  $\beta$ -lactámico con la serina nucleofílica de las PBP (Penicillin-Binding Proteins; Proteínas Fijadoras de Penicilina) de la pared bacteriana. Esto conlleva una apertura del anillo y una acilación irreversible de las PBP, lo que previene la formación de los entrecruzamientos de los transpeptidos de peptidoglicano e impide la formación de la pared (Tipper & Strominger, 1965; Sauvage *et al.*, 2008).

Los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos incluyen alteraciones en las PBPs que las hacen menos sensibles a la acción de los  $\beta$ -lactámicos, inactivación del antibiótico mediante la acción enzimática de enzimas  $\beta$ -lactamasas o la disminución de la concentración de antibiótico, bien mediante bombas de eflujo o por la disminución en la permeabilidad al antibiótico (Zimmermann & Rosselet, 1977; Li *et al.*, 1994; Rice, 1999; Bush, 2017).

Si bien es cierto que en muchos casos la resistencia clínica es multifactorial y el fenotipo es consecuencia de la combinación de diferentes mecanismos (Tooke *et al.*, 2019), la resistencia mediante acción enzimática es la más frecuente, al menos en bacterias Gram negativas. Existen diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas, siendo las más frecuentes las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBL) y las  $\beta$ -lactamasas AmpC.

Las diferentes  $\beta$ -lactamasas se pueden clasificar por su estructura primaria, tal y como propuso Amber en la década de los 80 (Ambler, 1980). Según este sistema, las  $\beta$ -lactamasas se podían dividir en 4 clases: A, B, C y D. Las clases A, C y D son enzimas serin-proteasas (enzimas con una

serina como aminoácido nucleofílico en su centro activo), mientras que las de clase B son metaloenzimas. De las 4 clases diferentes, son las  $\beta$ -lactamasas de clase A las más abundantes y, además, están frecuentemente codificadas en plásmidos conjugativos (Bush & Fisher, 2011).

Dentro de la clase A, las principales familias de  $\beta$ -lactamasas son las TEM, SHV y CTX-M. El éxito de estas familias es debido a su diseminación en plásmidos y otros elementos genéticos móviles dentro de un amplio rango de bacterias Gram negativas, principalmente *Enterobacteriaceae*, y su capacidad para incrementar el espectro de acción a medida que se han ido introduciendo nuevos  $\beta$ -lactámicos para su uso clínico. Así, debido a mutaciones puntuales, las TEM y SHV han llegado a desarrollado la capacidad para hidrolizar oximinocefalosporinas (como la cefotaxima y la ceftazidima), generando un fenotipo ESBL (Tooke *et al.*, 2019).

La primera  $\beta$ -lactamasa de la familia TEM caracterizada fue TEM-1, observada en 1963 en *E. coli* y *Salmonella* (Datta & Kontomichalou, 1965). TEM-1 es capaz de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de las primeras generaciones (Palzkill, 2018). Como se ha indicado anteriormente, debido a mutaciones han aparecido nuevas variantes de la familia TEM con capacidad para hidrolizar oximinocefalosporinas. Estas variantes son  $\beta$ -lactamasas tipo ESBL.

Las  $\beta$ -lactamasas SHV se encuentran principalmente en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, y se pueden dividir en 3 subgrupos en base a sus características moleculares o propiedades funcionales: el subgrupo 2b, que comprende a las variantes capaces de hidrolizar penicilinas y las cefalosporinas de las primeras generaciones y son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam; las pertenecientes al subgrupo 2br, que confieren resistencia de amplio espectro y además son resistentes al ácido clavulánico; y el subgrupo 2be que incluye a las variantes que también pueden hidrolizar algunas oximino  $\beta$ -lactamasas (Liakopoulos *et al.*, 2016).

Tanto los genes de la familia TEM como los de la familia SHV se suelen encontrar asociados a plásmidos (Carattoli, 2009), lo que explica la difusión de las  $\beta$ -lactamasas de estas familias a nivel mundial en cepas procedentes de todo tipo de ambientes y orígenes. El análisis de las secuencias que flanquean diversos genes SHV en cepas de bacterias Gram negativas, han mostrado cómo los genes codificantes de estas enzimas se encuentran asociados a secuencias de inserción, especialmente a IS26. Al igual que sucede con la mayoría de las resistencias, la movilización de los genes de resistencia por medio de las secuencias de inserción, IS26 en este caso, hacia plásmidos conjugativos, facilita la diseminación entre bacterias, tanto de la misma como de distintas especies (Liakopoulos *et al.*, 2016).

Otro tipo de  $\beta$ -lactamasas son las AmpC plasmídicas. Estas se encuentran tanto en cepas nosocomiales como no nosocomiales en todo el mundo, fenómeno facilitado por su presencia en plásmidos transmisibles. Existen diferentes familias de genes *AmpC*, aunque la más frecuente es la familia CMY, siendo los genes *CMY-2* los más frecuentes. Estas enzimas, además de ser activas frente a penicilinas, tienen una mayor actividad frente a cefalosporinas, pudiendo hidrolizar también cefamicinas y, a diferencia de las ESBLs, los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, como por ejemplo el ácido clavulánico, tienen un menor efecto sobre ellas (Jacoby, 2009).

En los plásmidos en los que se encuentran las  $\beta$ -lactamasas AmpC, se encuentran a menudo también otros genes de resistencia, incluyendo genes de resistencia a aminoglucósidos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima, además de genes ESBL (Jacoby, 2009). Además, el gen *AmpC* con frecuencia forma parte de un integrón, lo que contribuye a facilitar su expansión, aunque no está incorporado en un casete genético (Recchia & Hall, 1995; Jacoby, 2009).

La presencia de  $\beta$ -lactamasas en cepas aisladas de animales de consumo se ha observado en todo el mundo: en heces de cerdos y pollos de engorde en China (Tian *et al.*, 2012), en cerdo y pollos de engorde en España (Blanc *et al.*, 2006), en aislados de gallinas ponedoras, ganado y pollos de engorde en Japón (Hiki *et al.*, 2013) o en los Países Bajos en aislados de *E. coli* y *S. enterica* procedentes de pollos de engorde (Dierikx *et al.*, 2010), entre otros.

### 1.3.2. Resistencia a quinolonas

Las quinolonas empezaron a usarse en medicina clínica a finales de los años 60, con el uso del ácido nalidíxico para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas causadas por enterobacterias (Emmerson & Jones, 2003). Desde entonces, se han convertido en una de las clases de antibióticos más usados a nivel mundial (Aldred *et al.*, 2014).

Las dianas de acción de las quinolonas son la topoisomerasa tipo IIA, la topoisomerasa IV y la DNA girasa bacterianas (Hooper, 2003). Estas enzimas son las encargadas de generar aperturas en la doble hebra del cromosoma bacteriano y su función es vital para la replicación de la bacteria. Las quinolonas se unen a los complejos enzima-DNA (Kampranis & Maxwell, 1998) y causan la inhibición de la religación del DNA abierto por las topoisomerasas (Anderson *et al.*, 1999; Aldred *et al.*, 2014), lo que causa la muerte de las bacterias.

La resistencia a quinolonas suele ser debida a mutaciones cromosómicas que causan una disminución en la afinidad del antibiótico por la diana de acción o disminuyen la cantidad de moléculas de antibiótico que se pueden unir a esta. No obstante, también existen genes que se encuentran codificados en plásmidos transmisibles y que confieren resistencia a quinolonas (“resistencia a quinolonas transmitida por plásmidos”, PMQR). Estos mecanismos se empezaron a descubrir en la década de los 90 y se conocen 3 mecanismos PMQR. El primero de ellos está basado en la protección de la DNA girasa y la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas mediante proteínas de la familia de los “pentapéptidos repetidos” codificadas por los genes *qnr*; el segundo está relacionado con la acetilación de algunas quinolonas por acción de una variante de la enzima aminoglicósido acetiltransferasa AAC(6’)-Ib; finalmente, el tercer mecanismo se basa en el incremento del eflujo producido por las bombas QepAB y OqxAB. Aunque estos 3 mecanismos tan solo ofrecen un bajo nivel de resistencia, contribuyen a facilitar la selección de cepas con un mayor nivel de resistencia y hacen que los patógenos que contienen estos genes sean más difíciles de tratar (Jacoby, 2017).

Los principales genes PMQR son los de la familia *qnr*, y entre estos, se encuentran los genes *qnrB* y *qnrS* (Fàbrega *et al.*, 2009). Los plásmidos Qnr se han encontrado en cepas de la familia Enterobacteriaceae de todo el mundo, en especial en aislados de *Escherichia coli*, *Enterobacter*

*cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella entérica* y, raramente, en especies no fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* (Robicsek *et al.*, 2006; Strahilevitz *et al.*, 2009). Además, los plásmidos que contienen genes *qnr* varían tanto en tamaño como en grupo de incompatibilidad, lo que indica que ha sido la transmisión de diferentes plásmidos la responsable de la diseminación de estos genes. Asimismo, a los genes *qnr* casi siempre suele ir asociado un elemento genético móvil, especialmente las secuencias de inserción *ISCR1*, *ISEcp1* e *IS26*, y es debido a esta asociación común con elementos genéticos móviles, que los genes *qnr* se pueden encontrar frecuentemente asociados a genes de resistencia a otras clases de antibióticos, como genes ESBL y genes de resistencia a carbapenems (Jacoby, 2017).

### 1.3.3. Resistencias a tetraciclinas

Al igual que los  $\beta$ -lactámicos, las tetraciclinas se encuentran entre los primeros antibióticos que empezaron a usarse y son activos tanto frente a bacterias Gram positivas como negativas. Actúan uniéndose a una región muy conservada del rRNA 16S de la subunidad ribosomal 30S, impidiendo la elongación durante la síntesis de proteínas (Broderse *et al.*, 2000; Pioletti *et al.*, 2001).

La resistencia se atribuye a la adquisición de genes presentes en plásmidos u otros elementos móviles, a mutaciones en el lugar de unión del ribosoma o a mutaciones cromosómicas que causan un incremento en la expresión de mecanismos intrínsecos de resistencia (Grossman, 2016).

Los mecanismos de resistencia a la tetraciclina son el eflujo activo, la protección del ribosoma y la inactivación enzimática de la molécula de antibiótico, siendo los dos primeros los más frecuentes. La protección del ribosoma se da por la acción de las Proteínas de Protección Ribosomal a la Tetraciclina (RPPs). Los genes codificantes de RPPs se encuentran diseminados entre las poblaciones bacterianas en elementos genéticos móviles, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas (Roberts, 2011). De este tipo de genes, los más comunes y los que mejor se conocen son *tetO*, *tetM* y *tetS* (Grossman, 2016). Por su parte, las bombas de eflujo específicas para tetraciclinas más comunes pertenecen a la clase de transportadores de la familia “Major Facilitator Superfamily” (MFS) (Chopra & Roberts, 2001), proteínas integrales de la membrana que se encuentran en diversos géneros bacterianos (Thaker *et al.*, 2010). Los genes más frecuentes que codifican para estas bombas son *tetA* y *tetB* en Gram negativas, mientras que en Gram positivas son *tetK* y *tetL* (Grossman, 2016).

En el portal web de la Universidad de Washington se mantiene una lista actualizada de los diferentes genes de resistencia a tetraciclinas y su mecanismo de acción (Roberts, s.f.). En la última actualización de esta lista, de abril de 2019, se indica de la presencia de 33 genes para mecanismos de eflujo, 13 para protección del ribosoma, 13 para la inactivación enzimática antibiótico y 1 gen con mecanismo aún desconocido.

#### 1.3.4. Resistencias a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>)

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B se suelen considerar en su conjunto cuando se habla de resistencias a antibióticos, ya que los 3 comparten sitios de unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, lo que hace que con frecuencia tengan mecanismos de resistencia comunes (Jacoby, 2018).

De entre los diferentes genes de resistencia, los más comunes son los *erm*, que codifican para una metilasa. Se han observado más de 40 genes *erm* diferentes, muchos de los cuales se encuentran en plásmidos, transposones y elementos conjugativos o integrativos (Weisblum, 1995). El mecanismo de acción de las proteínas *erm* es la adición de 1 o 2 grupos metilo a la adenina 2058 que se encuentra en el dominio V del rRNA 23S, lo que impide la unión de los antibióticos MLS<sub>B</sub>. Los genes *ermA*, *ermB* y *ermC* se encuentran frecuentemente en estafilococos, mientras que en enterococos y estreptococos son los genes *ermA* y *ermB* los más observados. El gen *ermA* es parte del transposón Tn554 o del plásmido relacionado Tn6133, mientras que el gen *ermB* forma parte de los transposones Tn917 y Tn551. Por su parte, el gen *ermC* se encuentra localizado con frecuencia en pequeños plásmidos (Jacoby, 2018).

#### 1.4. *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* como organismos indicadores de resistencias a antibióticos

##### 1.4.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyo nicho es el intestino de animales y humanos. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas (cepas comensales) y contribuyen a la salud intestinal. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* son patógenas y pueden causar gastroenteritis o enfermedades extraintestinales. Las cepas causantes de gastroenteritis se transmiten a través del agua o los alimentos contaminados, o por contacto con animales o personas (CDC, 2014).

*E. coli* se usa como indicador representativo de resistencias a antibióticos en bacterias Gram negativas, debido a que se encuentran comúnmente en las heces de animales y humanos, puede ser relevante en clínica y a menudo puede adquirir plásmidos conjugativos. Las cepas de *E. coli* comensales resistentes presentes en el intestino de los animales de consumo constituyen un reservorio de resistencias que, mediante transferencia horizontal, pueden transferirse a otras bacterias, incluyendo las zoonóticas, presentes en la cadena alimentaria o el intestino humano (EFSA & ECDC, 2019). Además, debido a que la mayoría de los animales usados para producción de alimentos son portadores de *E. coli*, se pueden desarrollar muestreos aleatorios para la monitorización de resistencias. Esto permite reducir el sesgo del muestreo, además de permitir realizar extrapolaciones desde las poblaciones aleatorias hacia la población diana de la que se deriva la muestra (EFSA & ECDC, 2012).

Determinar la incidencia de resistencias a antibióticos en una muestra representativa de *E. coli*, aporta por tanto información muy útil para investigar la relación entre la ocurrencia de resistencias y la presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos en la población de bacterias presentes en el intestino de los animales. Estas bacterias son especialmente útiles para la monitorización de bacterias productoras de ESBL (EFSA & ECDC, 2019).

#### 1.4.2. *Enterococcus*

El género *Enterococcus* lo constituyen bacterias Gram positivas comensales, aunque en ocasiones pueden actuar como patógenos oportunistas y causar infecciones. Dentro de este género, las especies *E. faecalis* y *E. faecium* se consideran buenos indicadores de resistencias a antibióticos en Gram positivos, ya que se aíslan comúnmente de las heces de animales (EFSA & ECDC, 2015). Además, estas dos especies tienen importancia clínica, en especial las cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina, que pueden ser resistentes a todos o casi todos los antibióticos usados para el tratamiento de las infecciones por esta especie (Arias *et al.*, 2010).

Al igual que en el caso de *E. coli*, las cepas de estas dos especies presentes en el tracto intestinal de animales y en los alimentos pueden actuar como reservorios de genes de resistencias, existiendo la posibilidad de transferencia de estos genes hacia otras especies, tanto comensales como patógenas (EFSA & ECDC, 2015), suponiendo un riesgo para la salud pública. Además, la monitorización de resistencias en enterococos aislados de animales permite también la obtención de datos importantes para determinar la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos durante la cría de los animales de consumo.

### 1.5. Co-selección de resistencias a antibióticos

El uso de antibióticos facilita la selección de cepas bacterianas con mecanismos de resistencia para el antibiótico usado. Además, es posible que se dé también la selección de resistencias a diferentes antibióticos y clases de antibióticos a los usados en el tratamiento, en un proceso conocido como co-selección.

Se ha visto como el uso de un antibiótico favorece también la selección de resistencias a otras clases de antibióticos. Pouwels *et al.* (2019) observaron, en cepas clínicas de *E. coli* procedentes de urinocultivos, una asociación positiva entre las resistencias a amoxicilina y ciprofloxacina después del uso de amoxicilina en los pacientes. Otros estudios (Brown *et al.*, 2019) han mostrado como el uso profiláctico en piensos de antibióticos no considerados como prioritarios, puede dar lugar a la co-selección de bacterias resistentes, incluidas resistencias a antibióticos con importancia clínica.

La co-selección es debida a la frecuente presencia de genes de resistencia a diferentes familias en un mismo plásmido. Por ejemplo, Pal *et al.* (2015) observaron que los genes de resistencia a sulfonamidas,  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas son particularmente frecuentes en plásmidos. Además, observaron que la mayoría de los plásmidos que contienen elementos de resistencia tienden a ser conjugativos.

La co-selección de resistencias es importante sobre todo en el caso de infecciones producidas por bacterias multirresistentes, portadoras de genes de resistencia a varias clases antibióticas. Así, una población de bacterias multirresistentes puede expandirse como consecuencia de la exposición a un único antibiótico para el cual posee genes de resistencia, lo que da como resultado un incremento en la presencia y dispersión de los otros genes de resistencia entre la población bacteriana presente en el entorno (Brown *et al.*, 2019).

### 1.6. Resistencias a los antibióticos en animales de consumo y alimentos derivados

Aparte del evidente problema de las bacterias resistentes a los antibióticos en el ámbito hospitalario, estas bacterias también pueden suponer un problema en la producción primaria en el sector cárnico, incluyendo la avicultura, tanto por la posibilidad de complicar el tratamiento de infecciones bacterianas en animales de consumo, lo que supondría pérdidas económicas para los ganaderos, como por la posibilidad de transmisión hacia los consumidores a través de la cadena alimentaria.

Cuando las resistencias a antibióticos se dan en bacterias zoonóticas presentes en animales y alimentos, el tratamiento de las infecciones bacterianas en humanos puede verse comprometido (EFSA, s.f.). La infección por bacterias zoonóticas puede deberse a varios motivos, como la manipulación e ingestión de alimentos de origen animal poco cocinados o crudos, el contacto con heces de animales ya sea de forma directa o indirecta (por ejemplo, cuando se producen filtraciones al agua) o la manipulación de animales (CDC, 2019).

La presencia de resistencias en las granjas no solo es un problema en cuanto a la posible transmisión desde los animales a los alimentos, sino también por la posibilidad de la transmisión de bacterias resistentes hacia las personas en contacto con los animales. Dorado-García *et al.* (2018) observaron una gran similitud entre los genes ESBL/AmpC procedentes de aislados de los animales de granja (cerdos y pollos de engorde) y de las personas que estaban en contacto con estos, evidenciando la presencia de una transmisión directa entre los animales y los trabajadores de la granja.

A pesar de que no todos los antibióticos usados en veterinaria son de uso clínico, la posibilidad de la co-selección hace que el uso de muchos antibióticos tenga efecto en la selección de resistencias a otras clases de antimicrobianos (Enne, 2010), lo que puede causar problemas en el tratamiento de infecciones en el ámbito clínico.

Todo esto pone de manifiesto la necesidad de reducir el uso de antibióticos en la producción primaria. Tal y como algunos investigadores han indicado (Collignon *et al.*, 2016), para reducir el desarrollo y expansión de bacterias resistentes transmitidas por alimentos, se debe reducir el uso de antimicrobianos tanto en veterinaria como en clínica. De hecho, la reducción en la prevalencia de resistencias como consecuencia del descenso en el uso de antibióticos ha sido observada en algunos países. Por ejemplo, en Quebec (Canadá) se prohibió el uso de ceftiofur (cefalosporina de 3ª generación) en las incubadoras de pollos y se observó un descenso en la

tasa de resistencias, tanto en *Salmonella enterica* serovar Heidelberg aislada de humanos como en *E. coli* procedente de carne de pollo (Dutil *et al.*, 2010).

La presencia de bacterias resistentes en los alimentos es un riesgo para la salud ya que, a través de la cadena alimentaria, estas bacterias pueden llegar a colonizar al consumidor. Cuando los animales son sacrificados y procesados, las bacterias intestinales pueden contaminar la carne y los productos elaborados con alimentos de origen animal. Además, las bacterias resistentes presentes en las heces de estos animales pueden pasar al ambiente, expandirse a través del agua y contaminar los productos irrigados con agua contaminada (CDC, 2019).

Una de las resistencias más preocupantes en la actualidad es la resistencia a cefalosporinas, ya que estos antibióticos se consideran de importancia clínica prioritaria, y de hecho están consideradas como un riesgo importante para la salud pública por parte de la EFSA (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) & EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2012). En estudios en carne de pollo se han llegado a observar niveles de resistencia a cefalosporinas muy elevados, superiores al 90% de las muestras analizadas, en diferentes países como Francia (Casella *et al.*, 2017), Países Bajos (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011) o España (Egea *et al.*, 2012). También se han observado resistencias a otros antibióticos como tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos o fenicoles en *Escherichia coli* aisladas de carne de pollo en Europa (Casella *et al.*, 2017). En Europa también se han detectado, aunque en niveles muy bajos, resistencias a carbapenemes en aislados de *E. coli* procedentes de carne de cerdo y pollo. Asimismo, se han llegado a observar resistencias simultáneas a varios antibióticos de importancia crítica en cepas de *E. coli*, *Campylobacter* y *Salmonella*, aunque afortunadamente en niveles muy bajos (ECDC, 2018a). De hecho, tal y como se muestra en el informe de EFSA sobre resistencias a antibióticos en cepas aisladas de humanos, animales de consumo y alimentos (EFSA & ECDC, 2018; EFSA & ECDC, 2019), en general se observan resistencias a un amplio rango de antibióticos, así como multirresistencias, en cepas de *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* procedentes de animales y canales de cerdos, terneros, pollos de engorde y pavos. No obstante, los resultados varían en función del país de origen, habiendo generalmente menores niveles de resistencia en los países nórdicos.

Aparte de las posibles toxiinfecciones ocasionadas por bacterias resistentes presentes en los alimentos, se ha de considerar también el riesgo de la transmisión de las mismas resistencias. Es importante tener en cuenta que la transmisión de genes de resistencia desde las bacterias presentes en los alimentos hacia las endógenas del intestino humano es un evento probable (Schjørring & Krogfelt, 2011). Esto podría alterar la composición y función de la microbiota intestinal del consumidor. Además, el intestino humano podría convertirse en un reservorio de resistencias, actuando como un nuevo foco de diseminación de dichas resistencias en el ambiente (Losasso *et al.*, 2018), y dificultando el tratamiento de infecciones en el caso de que se den transferencias de resistencias ente bacterias patógenas y las bacterias comensales resistentes del hospedador.

En el caso particular de la avicultura, debido a que tanto los huevos como la carne de pollo son una parte importante en la dieta de gran parte de la población española, es de especial interés

conocer y controlar la prevalencia de las resistencias a los antibióticos. Entre cepas procedentes de aves de corral, tanto pollos de engorde como ponedoras, se detectan con frecuencia resistencias a antibióticos, incluyendo a algunos de importancia crítica, como las cefalosporinas (Dame-Korevaar *et al.*, 2017; EFSA & ECDC, 2018; Moreno *et al.*, 2019). En cuanto a la presencia de genes codificantes para ESBL y AmpC, diferentes estudios han demostrado que su prevalencia es elevada en cepas procedentes de aves de corral (Blaak *et al.*, 2015; Huijbers *et al.*, 2016; Dame-Korevaar *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, es imprescindible el estudio y la monitorización de resistencias a antibióticos, tanto en las granjas y animales, como en los alimentos, para conocer a qué antibióticos se observan resistencias, la tasa de estas y su dispersión entre las poblaciones bacterianas de los animales de consumo. Todo ello permite la elaboración de políticas basadas en la evidencia científica, encaminadas a la reducción de la expansión de bacterias resistentes a los antibióticos, así como disponer de datos para medir el éxito de las políticas aplicadas.

## 2. Objetivos

La avicultura, tanto de puesta como de producción de carne, es una de las principales actividades ganaderas. Además, el consumo de sus productos presenta una tendencia al alza a nivel mundial. Estos productos son parte importante en la dieta debido a que, por su composición, rica en proteínas y baja en grasas, gozan de muy buena aceptación por el consumidor.

Teniendo en cuenta que algunos de estos productos, como los huevos, son susceptibles de consumirse crudos o poco cocinados, es de especial importancia, no solo asegurar la ausencia de patógenos zoonóticos, sino también contribuir en la medida de lo posible a que estos productos no actúen como reservorio de resistencias a antibióticos que puedan transferirse al consumidor. Para ello, además de los sistemas de vigilancia de zoonosis, es importante realizar estudios de vigilancia de la distribución de resistencias a los antibióticos en cepas procedentes de la producción primaria, con el fin de que los órganos competentes tomen las acciones adecuadas para minimizar el riesgo.

Así mismo, considerando que en la actualidad las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos son causantes de la muerte de miles de personas a nivel global, es de especial interés conocer la prevalencia de resistencias, en especial a los antibióticos de interés clínico, en aquellos sectores susceptibles de actuar como reservorio y medio de transmisión de estas hacia la población.

Para conocer el estado de las resistencias a los antibióticos es imprescindible la realización de estudios de vigilancia usando microorganismos indicadores, como *Escherichia coli* (para bacterias Gram negativas) y *Enterococcus* (para Gram positivas) ya que, por sus condiciones de ubicuidad en el intestino de los animales además de su capacidad de actuar como reservorio de genes de resistencia, permiten estimar las posibles resistencias a antibióticos presentes en la población bacteriana del ambiente en el que se encuentran.

Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la presencia de resistencias a antibióticos y de cepas multirresistentes en cepas procedentes de huevos de distintos sistemas de producción y/o comercialización: convencionales, ecológicos y de particulares para consumo doméstico.
- 2) Determinar si los distintos sistemas de producción de los huevos estudiados afectan a la frecuencia de aparición de resistencias a los antibióticos.
- 3) Caracterizar el riesgo para el consumidor en base a la frecuencia de resistencias a los antibióticos detectadas, así como la importancia de estos en el ámbito clínico, para cada uno de los diferentes sistemas de producción de huevos.
- 4) Determinar el efecto de la administración de distintos tratamientos de un antibiótico de uso veterinario (amoxicilina) en la selección de resistencias a antibióticos en cepas de *E. coli* procedentes de pollos de engorde al nacimiento y durante su periodo de cría.

- 5) Determinar la presencia de multirresistencias y de resistencias a antibióticos de importancia crítica en cepas aisladas de meconios y/o heces de manadas de gallinas de cría (fase I), correspondientes a aves de 1 día de vida y pollitas, y en manadas de gallinas reproductoras adultas (fase II) en explotaciones avícolas comerciales.
- 6) Determinar la presencia de algunos de los genes de resistencia a antibióticos más frecuentes, en especial a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y macrólidos, en *E. coli* y/o *Enterococcus* procedentes de meconios y/o heces de manadas de gallinas de cría (fase I) y en manadas de gallinas reproductoras adultas (fase II).
- 7) Determinar si se dan cambios en la prevalencia de las diferentes resistencias a los antibióticos durante el crecimiento de las gallinas en una explotación comercial, abarcando todo el ciclo de producción, desde la fase de manadas de cría (fase I) hasta la fase de manadas de aves reproductoras adultas (fase II).

### 3. Capítulo 1. Caracterización del riesgo de la resistencia a antibióticos en bacterias potencialmente peligrosas para la salud humana aisladas de huevos ecológicos, domésticos y convencionales

Fenollar A., Doménech E., Ferrús M. A., & Jiménez-Belenguer A. (2019). Risk characterization of antibiotic resistance in bacteria isolated from backyard, organic, and regular commercial eggs. *Journal of Food Protection*, vol. 82, No. 3, pp. 422-428.

#### 3.1. Materiales y métodos

##### 3.1.1. Muestreo de los huevos

Se consideraron tres tipos de producción para el estudio: huevos convencionales, ecológicos y de producción doméstica. Los huevos convencionales proceden de gallinas que se han criado en sistemas de alojamiento convencionales, también denominados sistemas de producción intensiva. Los huevos de producción ecológica provienen de gallinas que se han criado en sistemas de alojamiento con acceso libre al exterior y se alimentan tan solo de alimento certificado como ecológico, lo que significa que está producido a partir de ingredientes obtenidos sin pesticidas, herbicidas o fertilizantes convencionales. Por último, los huevos de producción doméstica se obtienen generalmente sin propósito comercial y las gallinas se crían en sistemas de alojamiento más tradicionales y con libre acceso al ambiente exterior.

Se seleccionaron cinco productores diferentes para cada tipo de huevo, todos de origen local. Se analizaron un total de 34 huevos convencionales, 16 ecológicos y 10 domésticos.

##### 3.1.2. Aislamiento de *Salmonella* spp.

Para el aislamiento de *Salmonella* se siguieron las indicaciones de la norma ISO 6579:2003/A1:2007. Tanto el interior de los huevos como la cáscara se pre-enriquecieron en agua de peptona tamponada (APT; Buffered Peptone Water (ISO), Scharlau, Barcelona, España) durante 18 horas a 37°C. Después del pre-enriquecimiento, se realizó un enriquecimiento selectivo transfiriendo 0,1 mL a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV; BD Sparks, MD, USA), que se incubó durante 24 horas a 42°C; y 1 mL del pre-enriquecimiento a 10 mL de caldo Müller-Kauffmann (MKTTn, Scharlau, Barcelona, España; Iodine resublimed purissium, Panreac, Barcelona, España; Potassium Iodure purissium, Panreac, Barcelona, España; Novobiocin sodium salt, Sigma-Aldrich, USA), que se incubó durante 24 horas a 37°C.

Después de la incubación, se sembraron una placa de agar XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar, Scharlau, Barcelona, España) y una de agar Hektoen (HK Hektoen Enteric Agar, Scharlau,

Barcelona, España) desde cada uno de los medios de enriquecimiento, y se incubaron ambos medios a 37°C durante 24 horas. Las colonias sospechosas de ser *Salmonella* se sembraron en Agar TSI (Triple Sugar Iron Agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y a las que mostraban el patrón de crecimiento esperado para *Salmonella*, se las identificó mediante la galería miniaturizada de pruebas bioquímicas API-20E (Biomérieux, France).

### 3.1.3. Aislamiento de *Escherichia coli*

Se partió del mismo pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada usado para la detección de *Salmonella*. Se sembraron en superficie y por duplicado las diluciones decimales  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  del pre-enriquecimiento, además de una placa en triple estría, en placas de agar TBX (TBX Medium, OXOID Ltd., England, UK), que se incubaron a 44°C durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, se seleccionaron aleatoriamente 5 colonias que presentaban el aspecto característico de *E. coli*, se transfirieron a placas de agar Plate Count (PC agar, Scharlau, Barcelona, España) y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

A partir de los aislados en agar PC se realizó la identificación de *E. coli* mediante la batería miniaturizada API-20E (Biomérieux, France). Las colonias positivas se seleccionaron y congelaron a -80°C para análisis posteriores.

### 3.1.4. Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

La detección de *L. monocytogenes* se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la norma ISO 11290-1:1997/A1:2005. A partir del pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada usado para la detección de *Salmonella*, se transfirieron 0,1 mL a 10 mL de caldo selectivo Fraser (Listeria Enrichment Broth, Scharlau, Barcelona, España), que se incubó a 37°C durante 48 horas. Después de la incubación, se inocularon una placa de agar ALOA (Chromogenic Listeria Agar, Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) y una de agar PALCAM (Scharlau, Barcelona, España) con 100 µL de medio de enriquecimiento y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

### 3.1.5. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas aisladas se realizó mediante el método de difusión disco-placa (Antimicrobial Susceptibility Test Disc, OXOID Ltd., England, UK) en placas de agar Mueller-Hinton (BBLTM Mueller-Hinton II Agar, BD). Todas las cepas se testaron frente a 12 antibióticos de importancia veterinaria y clínica: amikacina (AK) 30 µg, amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) 3 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, cloranfenicol (C) 30 µg, ciprofloxacino (CIP) 5 µg, gentamicina (CN) 10 µg, ceftriaxona (CRO) 30 µg, kanamicina (K) 30 µg, cefalotina (KF) 30 µg, ácido nalidíxico (NA) 30 µg, estreptomina (S) 10 µg y tetraciclina (TE) 30 µg. La cepa *E. coli* ATCC 25922 se usó como control negativo. La determinación de los niveles de resistencia y el procedimiento se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Cuando dos o más aislados del mismo huevo presentaron el mismo patrón antimicrobiano, se consideraron como clones, y solo una de esas colonias se usó para el análisis estadístico.

### 3.1.6. Extracción del DNA

Todas las extracciones de DNA se realizaron mediante el kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, USA), de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

### 3.1.7. Detección de los genes de resistencia a antimicrobianos mediante PCR múltiple (mPCR)

Se detectaron genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBL),  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC y genes de resistencia a tetraciclinas.

Los genes *TEM* (ESBL), *SHV* (ESBL) y *CMY-2* (AmpC) se detectaron mediante una PCR múltiple (mPCR). Los genes de resistencia a tetraciclinas *tetA*, *tetB* y *tetC*, se detectaron mediante otra PCR múltiple. Los iniciadores y las condiciones usadas fueron las descritas por Lanz *et al.*, (2003) y por Kozak *et al.* (2009) (Tabla 1).

PCR	Gen	Iniciadores	Secuencia de los iniciadores	Concentración de iniciadores	Amplicón (bp)	Ref.
1	<i>tetA</i>	TetA-F	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	0,1 $\mu$ M	502	Lanz et al. (2003)
		TetA-R	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	0,1 $\mu$ M		
	<i>tetB</i>	TetB-F	CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC	0,2 $\mu$ M	173	Goswami et al. (2008)
		TetB-R	CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG	0,2 $\mu$ M		
	<i>tetC</i>	TetC-F	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT	0,5 $\mu$ M	888	Lanz et al. (2003)
		TetC-R	GCCGGAAGCGAGAAGAATCA	0,5 $\mu$ M		
2	<i>TEM</i>	TEM-F	TTAACTGGCGAACTACTTAC	0,5 $\mu$ M	247	Kozak et al. (2009)
		TEM-R	GTCTATTCGTTTCATCCATA	0,5 $\mu$ M		
	<i>CMY-2</i>	CMY-F	GACAGCCTCTTCTCCACA	0,25 $\mu$ M	1,000	
		CMY-R	TGGACACGAAGGCTACGTA	0,25 $\mu$ M		
	<i>SHV</i>	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTTG	0,5 $\mu$ M	393	Colom et al. (2003)
		SHV-R	ATTTGCTGATTCGCTCG	0,5 $\mu$ M		

Tabla 1. Secuencia, concentración usada e iniciadores usados.

Cada una de las dos mPCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L con la siguiente concentración de los reactivos: 1x NH<sub>4</sub> Reaction Buffer (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline), 0,5 mM de cada dNTP (dNTP Mix 100mM, Bioline), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline), 1,25 U de Taq-DNA polimerasa (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline) a y la concentración indicada por los autores de cada uno de los iniciadores.

### 3.1.8. Caracterización del riesgo

La valoración de la exposición se estimó usando los porcentajes de resistencias a antimicrobianos obtenidos durante el estudio. En función de cada uno de los porcentajes se asignó uno de los criterios propuestos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (EFSA & ECDC, 2013). Los criterios asignados fueron: “Extremadamente alto (6)” >70%; “Muy alto (5)” 50-70%; “Alto (4)” 20-50%; “Moderado (3)” 10-20%, “Bajo (2)” 1-10%; “Muy bajo (1)” 0,1-1%; e “Infrecuente (0)” <0,1%.

La caracterización del riesgo se corresponde con dos criterios propuestos por el “Grupo asesor de la Organización Mundial de la Salud sobre la vigilancia integrada de las resistencias a los antimicrobianos” (WHO Advisory Group on Integrated Surveillance, 2013):

- a) Criterio 1 (C1): La clase del antimicrobiano es la única, o una de las terapias limitadas, para el tratamiento de infecciones bacterianas graves en humanos.
- b) Criterio 2 (C2): La clase del antimicrobiano se usa para el tratamiento de infecciones en humanos causadas por bacterias que pueden ser transmitidas a humanos por fuentes no humanas o por bacterias que pueden adquirir genes de resistencia de fuentes no humanas.

Por lo tanto, se pueden obtener 4 categorías:

“Insignificante (0)”: no hay consecuencias para la salud humana o están dentro de los límites normales

“Importante (1)”: Antimicrobianos que no cumplen ni C1 ni C2

“Importancia elevada (2)”: Antimicrobianos que cumplen C1 o C2

“Importancia crítica (3)”: Antimicrobianos que cumplen tanto C1 como C2.

La puntuación resultante de la caracterización del riesgo se puede así trasladar a categorías de riesgo cualitativas, definidas por el Codex Alimentarius (Codex, 2011). En este caso, los productos de la categorización del riesgo se asignan a las siguientes categorías:

- Sin riesgo adicional: valor = 0
- Algo de riesgo adicional: valor entre 1-6
- Elevado riesgo adicional: valor entre 7-12
- Riesgo adicional muy elevado: valor entre 13-18

Los rangos asignados se han establecido siguiendo las recomendaciones del Codex Alimentarius (2011), con el fin de asegurar una fácil interpretación de la caracterización de riesgo obtenida. El valor obtenido se obtiene al multiplicar el valor asignado a la categoría a la que pertenece el antibiótico (0-3) en base a los criterios de importancia de los antibióticos y el valor asignado con base al porcentaje de cepas resistentes para cada antibiótico (0-6).

### 3.1.9. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa informático Statgraphics Centurion XVI.II (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia). La posible relación entre el sistema de producción de los huevos y las resistencias a los diferentes grupos de antibióticos en *E. coli* se estableció mediante un Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA), en el que los sujetos (filas) y las variables (columnas) se representan de forma simultánea. Una posición cercana entre diferentes puntos indica un elevado nivel relativo de asociación. Por el contrario, cuando los puntos se encuentran en diferentes partes del eje, la asociación es baja. Las proporciones relativas se compararon usando el test de la  $X^2$  y el test exacto de Fisher. También se realizó una comparación de medias. Un valor de probabilidad inferior al 5% se consideró significativo.

## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1. Prevalencia de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli*

En los huevos analizados no se aisló ninguna cepa de *L. monocytogenes*. Este resultado se encuentra dentro de los valores esperados y coincide con un informe de EFSA del 2016 (EFSA & ECDC, 2016) en el que no se encontró este patógeno en ninguno de los ovoproductos que formaron parte de dicho estudio.

Se aisló una cepa de *Salmonella* del interior de un huevo de producción comercial. En el resto de los 59 huevos analizados (tanto del interior como del exterior) no se aisló ninguna cepa de *Salmonella*, lo que supone un 98,4% de huevos negativos para este microorganismo. EFSA, en su informe sobre la monitorización de zoonosis en 32 países europeos durante el año 2015 (EFSA & ECDC, 2016), informó de resultados similares e indicó que solo se aisló *Salmonella* en un 0,7% de un total de 5.619 huevos de mesa analizados. En otros estudios más antiguos la prevalencia de *Salmonella* fue mayor, observándose en un rango de entre el 0-7% (Mawer *et al.*, 1989; Perales & Audicana, 1989; Evans *et al.*, 1998; Humphrey, 1994).

Comparando los resultados obtenidos y los de EFSA con los de trabajos más antiguos se puede apreciar cómo en los últimos años se ha reducido considerablemente la contaminación de los huevos por *Salmonella*, al menos dentro de la UE. A esto pueden haber contribuido diferentes medidas preventivas: Por una parte, la legislación de la UE establece que los huevos no pueden ser comercializados para consumo humano directo como huevos de mesa si no proceden de manadas comerciales de gallinas ponedoras sujetas a un programa nacional de control de *Salmonella*, como se establece en la regulación CE 1237/2007 (European Commission, 2007). Por otra parte, en muchos países las manadas de gallinas ponedoras son vacunadas contra *Salmonella* Enteritidis, lo que junto a otras medidas de control enfocadas a evitar la entrada de *Salmonella* en las instalaciones (medidas de bioseguridad, control de vectores de transmisión y asegurar que los stocks de reemplazo estén libres de *Salmonella*) puede reducir la contaminación de los huevos (Trampel *et al.*, 2014).

*E. coli* se encuentra de forma natural en el tracto intestinal y se puede expandir fácilmente. Por este motivo es un indicador de las condiciones higiénicas del ambiente y se pueden encontrar cepas en las cáscaras de los huevos de cualquier forma de producción. Sin embargo, en huevos en buen estado no se debe encontrar en el interior del huevo. En el presente estudio no se aisló ninguna cepa del contenido interno de los huevos, independientemente de su procedencia. En el caso de la cáscara de los huevos sí se aislaron cepas de *E. coli*, aunque no de todas las muestras: Se aisló *E. coli* del 50% de los huevos de producción doméstica, el 37,5% de los huevos de producción ecológica y en el 11,8% de los huevos de producción convencional. Estos resultados indican una baja prevalencia de *E. coli* en la superficie de los huevos comercializados en España, independientemente de su forma de producción.

Los huevos de producción convencional tuvieron valores más bajos que los ecológicos, debido posiblemente a una mayor automatización de la recolección y procesado de los huevos. En otros estudios llevados a cabo con huevos de producción convencional, los valores de prevalencia de *E. coli* también fueron bajos. En un estudio realizado en Australia se detectó *E. coli* en 35 de un total de 500 cáscaras de huevo (7%) (Chousalkar *et al.*, 2010). En España, en un estudio reciente (Grande Burgos *et al.*, 2016) se informó de un valor algo superior al que nosotros observamos, aislándose de 34 cáscaras de huevo de un total de 180 huevos de producción convencional (19%).

Los huevos de producción doméstica fueron los que presentaron una mayor prevalencia de *E. coli*. Esto posiblemente se debe al hecho de que, al no producirse con fines comerciales, las condiciones higiénicas de las gallinas no son tan estrictas y los huevos no se recolectan con tanta frecuencia, lo que favorece una mayor contaminación de la cáscara del huevo tras su puesta.

### 3.2.2. Resistencia a antibióticos

De las cáscaras de los huevos de producción convencional se aislaron 17 cepas de *E. coli*, de las provenientes de huevos ecológicos se aislaron 29 cepas y de las originarias de huevos domésticos se aislaron 25.

Los resultados obtenidos para el único aislado de *Salmonella* mostraron que esta cepa era sensible a todos los antibióticos testados, excepto a CIP y AMC. Estos resultados se muestran acordes con otros estudios donde también se observaron bajos perfiles de resistencia en cepas de *Salmonella* aisladas de gallinas ponedoras en Reino Unido (Snow *et al.*, 2007).

Con relación a las cepas de *E. coli*, se realizó un MCA a partir de los resultados obtenidos en los antibiogramas, con la finalidad de evaluar los efectos globales del modo de producción de los huevos en el perfil de sensibilidad (sensible, intermedio y resistente) a los diferentes antibióticos testados (Figura 1).

Respecto al eje X, los resultados de “resistente” e “intermedio” se ubican en la parte derecha, mientras que el valor “sensible” se halla en la izquierda. Considerando que cuanto más cercanos se hallan los puntos a una posición, más cercana es la relación, los resultados muestran que las cepas aisladas de huevos de producción convencional y doméstica tienen

mayores porcentajes de valores de sensibilidad “sensible” mientras que los huevos de producción ecológica tienen valores porcentuales mayores para valores de sensibilidad “resistente”. Considerando también que diferentes partes del eje implican una baja relación, los resultados muestran que AMC se encuentra al otro lado del valor “sensible”, indicando que *E. coli* tiene un valor más elevado de “resistente” o “intermedio” para este antibiótico. Del mismo modo, K, AK y CRO tuvieron la respuesta más baja para “resistente”.

Cuando se considera el eje Y se observan pocas diferencias. A pesar de todo, la posición central de la AMC entre las respuestas de “intermedio” y “resistente” confirma que las cepas de *E. coli* aisladas tienen un elevado porcentaje para ambas respuestas.

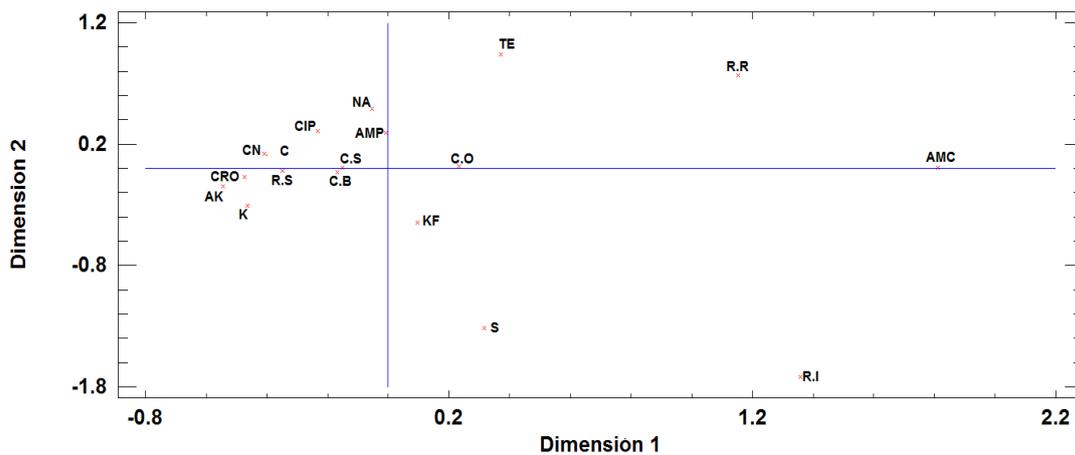


Figura 1. Análisis de Correspondencia Múltiple entre las cepas de *E. coli* aisladas y la respuesta al antibiograma (R.S=sensible; R.R= resistente; R.I= intermedio), considerando el estilo de producción (C.S= Convencional; C.B= Doméstico; C.O= Ecológico).

En nuestro estudio no pudimos aislar tantas cepas de *E. coli* de los huevos convencionales como de los otros dos orígenes, a pesar de muestrear un mayor número de huevos convencionales. Esto puede haber ocasionado alguna subestimación de la carga de resistencias para este origen. Este bajo número de aislados pueden deberse a las condiciones de higiene durante la producción, tales como la exclusión de huevos sucios y, en algunos casos, el uso de radiación UV. De hecho, la normativa europea establece que los huevos no pueden ser lavados o limpiados para evitar dañar la cáscara del huevo (European Commission, 2008).

En la Figura 2 se muestran los perfiles de sensibilidad de *E. coli* de los tres tipos de sistema de producción de huevos para los 12 antibióticos usados en este estudio. El mayor número de resistencias se encontró en cepas de *E. coli* aisladas de huevos de producción ecológica (56,9% del total de resistencias), seguidas de las aisladas de huevos domésticos (24,8%) y convencionales (18,25%). Las cepas aisladas de huevos ecológicos fueron las únicas que mostraron valores de sensibilidad “resistente” o “intermedio” para todos los antibióticos ensayados, observándose resistencia para 9 de los 12 antibióticos. En las cepas aisladas de huevos convencionales y domésticos solo se observaron resistencias para 5 de los 12 antibióticos. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Álvarez-Fernández *et al.* (2012), quienes observaron que la frecuencia de resistencias era mayor en cepas de *E. coli* aisladas de huevos de sistemas de producción convencional que, en las aisladas de huevos de origen

ecológico o doméstico, sobre todo en el caso de resistencias a  $\beta$ -lactámicos (AMC) y tetraciclinas.

Para las cepas procedentes de huevos de producción ecológica, el mayor porcentaje de resistencias fue para la AMC (58,6%, 17 cepas), seguido de TE (51,7%, 15 cepas). Para la AMP, NA y CIP se observó un 34,48% de resistencias (10 cepas). Tanto para C como para CN se observaron un 17,2% (5 cepas) y para KF, un 3,5% (1 cepa). Valores de sensibilidad intermedia se observaron sobre todo para AMC (37,9%, 11 cepas), S (27,6%, 8 cepas) y KF (24,1%, 7 cepas). En el caso de CRO se observó un 3,5% (1 cepa). Para ninguno de los antibióticos se obtuvo un porcentaje del 100% de sensibilidad entre las cepas aisladas de huevos de este origen.

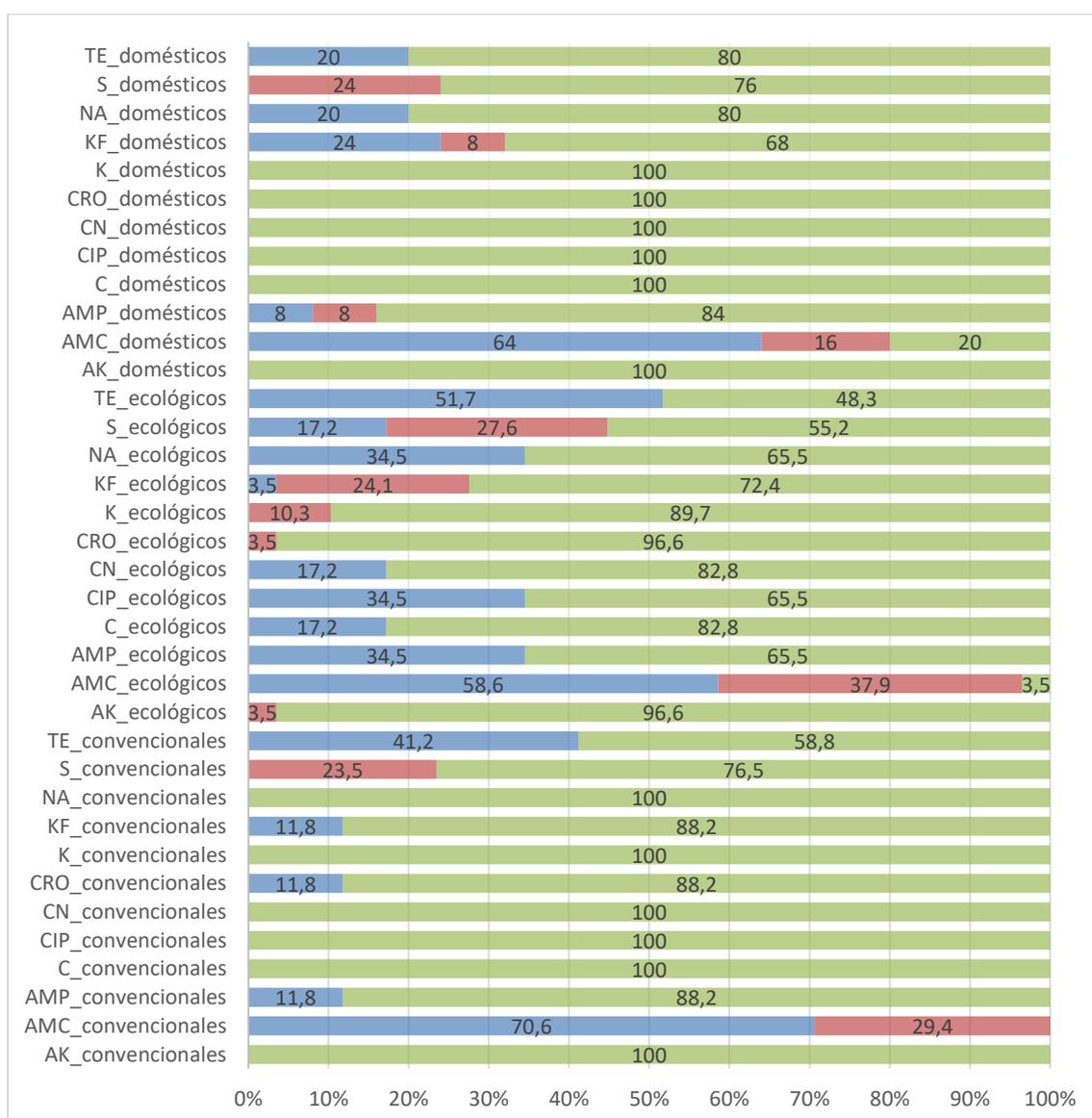


Figura 2. Perfiles de sensibilidad a los 12 antibióticos testados en el estudio en los 3 sistemas de producción de huevos. Azul =resistente; Rojo = intermedia; Verde = sensible.

En las cepas provenientes de huevos convencionales, las mayores tasas de resistencia se observaron también para AMC y TE, con un 70,6% (12 cepas) y 41,2% (7 cepas) respectivamente. Se observaron resistencias también, aunque en menor porcentaje, para CRO,

AMP y KF (11,8%, 2 cepas en las tres). No se observó ninguna resistencia para CIP, AK, C, CN ni NA.

Finalmente, en las cepas aisladas de los huevos de producción doméstica la mayoría de las resistencias se observaron para AMC (64%, 16 cepas), seguida de KF (24%, 6 cepas), TE y NA (20% ambos, 5 cepas) y AMP (8%, 2 cepas). Todos los aislados de este origen fueron sensibles a C, CIP, CN, CRO, K y AK.

La mayoría de los estudios realizados en nuestro entorno presentan resultados acordes con los nuestros: Grande Burgos *et al.* (2016) analizaron 27 aislados de *E. coli* procedentes de 180 huevos de producción convencional, observando que la resistencia a AMP era mayoritaria (37,03%). Este valor es significativamente más elevado que el observado en nuestro estudio para las cepas de origen convencional y doméstico, pero similar al obtenido en las cepas de origen ecológico. Además, la prevalencia que observaron para las resistencias a S y TE fue también elevada (37,03% para ambas), mientras que, en nuestro estudio, ni las cepas de huevos convencionales ni las de huevos domésticos presentaron resistencia a S, aunque sí a TE (41,2% en los convencionales y 20% en los domésticos) y el porcentaje de resistencia a TE fue aún mayor en cepas de huevos ecológicos (51,7%). En este origen se observaron también cepas resistentes a S, aunque en menor porcentaje (17,2%). Las resistencias que observaron en su estudio para C fueron bajas (11,11%), aunque más elevadas que las observadas en este trabajo, en el que todas las cepas fueron sensibles excepto en las cepas de origen ecológico, en las que el porcentaje fue ligeramente superior (17,24%). También observaron un 18,21% de cepas resistentes a NA, mientras que en nuestro caso no se observaron en cepas procedentes de huevos convencionales, sino solo en cepas de origen ecológico (34,48%) y doméstico (20%). Musgrove *et al.* (2006), de un total de 194 aislados de *E. coli* provenientes de cáscaras de huevos convencionales, informaron de valores de resistencias a TE del 29,9%, del 6,2% para S y del 3,1% para CN. Por otra parte, teniendo en cuenta la dificultad para obtener datos de nuestro entorno relacionados con resistencias a antibióticos en huevos, comparamos también los resultados con resultados procedentes de aislados de *E. coli* procedentes de productos avícolas. Así, Sáenz *et al.* (2001), a partir de 47 aislados de *E. coli* procedentes de alimentos de origen avícola observaron un 53% de aislados resistentes a NA y TE, 47% a AMP, 40% a K, 13% a CIP y AMC, 17% a CN y 8% a C.

La baja prevalencia de resistencia a quinolonas en las cepas provenientes de huevos convencionales ha sido inesperada, ya que este grupo de antibióticos son de los más usados en el sector avícola en España (Capita *et al.*, 2007) y por ello se esperaba niveles de resistencias más elevados en las cepas provenientes de sistemas de cría convencionales que en las de sistemas ecológicos o domésticos.

Los resultados de este estudio revelaron diferencias significativas, tanto para el factor "antibiótico" (P-valor 0,0001) como para el factor "origen" (P-valor 0,0009). La posible relación entre resistencia antibiótica y la forma de producción de los huevos, en las producciones ecológicas y domésticas particularmente, puede ser debido al hecho de que, aunque las gallinas no tienen contacto con antibióticos, sí lo tienen con bacterias de su entorno que son capaces de colonizar el tracto intestinal. Además, la transmisión vertical desde las gallinas

parentales no puede descartarse, considerando los resultados obtenidos en los estudios que se presenta posteriormente en esta tesis.

La presencia de cepas resistentes y de sensibilidad intermedia a CRO es preocupante, ya que este es un antibiótico de importancia crítica para la salud humana y su uso no está permitido en veterinaria en la UE (European Medicine Agency, 2009). La presencia de cepas que presentan una disminución de sensibilidad a CRO puede deberse a una co-selección con otras resistencias a diferentes clases de antibióticos.

### 3.2.3. Multirresistencia antimicrobiana

Se consideró como multirresistencia a la resistencia a 3 o más clases diferentes de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012).

De un total de 71 cepas de *E. coli* aisladas, 11 presentaron multirresistencia (15,49%). De las cepas obtenidas de los huevos convencionales no se aislaron cepas multirresistentes. Sin embargo, sí se aislaron tanto de los huevos ecológicos como domésticos: A partir de los ecológicos se aislaron 10 cepas (34,48%) y de los domésticos, 1 cepa (4%). Las resistencias a AMC, TE y NA se encuentran presentes en todas las cepas multirresistentes aisladas, mientras que AMP y CIP se encontraron en 10 de las 11 cepas.

(Tabla 2).

Sistema de producción	No. cepas multirresistentes (% por origen)	Perfil de Resistencias							
Doméstico	1 (4)	AMC						NA	TE
Ecológico	4 (13.79)	AMC	AMP	C	CIP			NA	TE
	1 (3.45)	AMC	AMP	C	CIP		KF	NA	S
	5 (17.24)	AMC	AMP		CIP	CN		NA	TE

Tabla 2. Multirresistencias en cepas de *E. coli* aisladas de huevos con diferentes sistemas de producción.

En comparación con otros estudios, el porcentaje de multirresistencias observado en este estudio es bajo. Adesiyun *et al.* (2007) observaron un porcentaje del 46,6% en 118 cepas de *E. coli* aisladas de huevos de mesa en Trinidad y, en un estudio realizado con pollos en Corea del Sur por Dessie *et al.* (2013), de un total de 99 cepas de *E. coli*, la prevalencia de cepas multirresistentes fue del 85,8%. Las diferencias que se observan pueden ser debidas a variaciones en la forma de cría de las gallinas, la estirpe y el criadero del que procedan las gallinas parentales, las diferencias que puedan existir en los diferentes tratamientos veterinarios con antibióticos disponibles en cada país, así como a las propias cepas de *E. coli* aisladas y la microbiota con la que puedan estar en contacto.

### 3.2.4. Genes de resistencia a antibióticos

En las cepas aisladas a partir de huevos ecológicos y domésticos se detectó al menos un gen de resistencia en casi todas (84% en domésticos y 82,76% en ecológicos), mientras que en el caso de las cepas de huevos convencionales se observaron en menos de la mitad (41,18%) (Tabla 3). Estos porcentajes se muestran acordes al fenotipo observado, ya que la mayoría de las resistencias se observaron en las cepas de huevos ecológicos y domésticos.

Los resultados que se han obtenido en este estudio sugieren que las diferencias en los procedimientos de cría de las gallinas y un contacto mayor con el medio externo pueden incrementar la posibilidad de ser colonizadas por cepas que contengan genes de resistencia. En ambos sistemas de producción, ecológico y doméstico, las gallinas disponen de libertad de movimiento y una mayor exposición al ambiente externo, menos controlable que el interior de las granjas de sistemas de producción convencionales. El mayor contacto con el medio exterior y la posibilidad de que las gallinas se alimenten de insectos o semillas presentes en el suelo pueden dar lugar a un incremento en el contacto con la microbiota ambiental, que podría colonizar el tracto gastrointestinal y transferir genes de resistencias a las cepas que conforman la microbiota propia de las gallinas. Este mecanismo de transmisión a partir del ambiente ha sido sugerido por algunos autores (Borges *et al.*, 2013) como la causa de la presencia de genes de resistencia en cepas aisladas de aves salvajes. Esto es especialmente probable en el caso de las gallinas domésticas, para las que el control suele ser prácticamente inexistente, ya que al criarse sin fines comerciales no están sometidas a regulaciones en materia de seguridad y sanidad.

En general, el gen que más se ha detectado en el estudio ha sido *TEM* (47,89% del total de las cepas), seguido de *tetA* (40,39%) y *tetB* (36,62%). El gen *CMY-2* se detectó en el 21,13% de las cepas y *tetC* en el 11,3%. Por su parte, el gen *SHV* solo se observó en una cepa (1,41%), aislada de un huevo de origen doméstico.

Origen	Genes detectados	Nº de cepas	% por origen	% de cepas con genes de resistencia
Ecológico (N=29) (n=24)	<i>TEM-CMY-tetA</i>	4	13,79	16.67
	<i>TEM-tetA</i>	5	17,24	20.83
	<i>TEM-tetA-tetB</i>	5	17,24	20.83
	<i>tetA</i>	5	17,24	20.83
	<i>CMY-tetA-tetB-tetC</i>	5	17,24	20.83
	Ningún gen	5	17,24	-
	≥1 gen	24	82,76	100
Doméstico (N=25) (n=21)	<i>TEM</i>	5	20	23.81
	<i>TEM-CMY</i>	2	8	9.52
	<i>TEM-CMY-tetB</i>	1	4	4.76
	<i>TEM-tetB</i>	2	8	9.52
	<i>TEM-tetA-tetB</i>	2	8	9.52
	<i>tetA-tetB</i>	2	8	9.52
	<i>tetC</i>	3	12	14.29
	<i>tetB</i>	3	12	14.29
	<i>SHV-TEM-tetB</i>	1	4	4.76
	Ningún gen	4	16	-
	≥1 gen	21	84	100
Convencional (N=17) (n=7)	<i>TEM-CMY-tetA-tetB</i>	3	17,65	42.86
	<i>TEM-tetA-tetB</i>	2	11,76	28.57
	<i>TEM-tetA</i>	2	11,76	28.57
	Ningún gen	10	58,82	-
	≥1 gen	7	41,18	100

Tabla 3. Presencia de genes de resistencia observados en cepas de *E. coli* aisladas de huevos procedentes de cada uno de los sistemas de producción

Para algunas cepas, aunque que el resultado de las mPCR indicó la presencia de diversos genes de resistencia, no se observó un fenotipo resistente. Esto puede ser debido a que el gen no se exprese correctamente debido a un promotor defectuoso, o a mutaciones en la secuencia que den lugar a una proteína defectuosa o menos activa. En el caso de las ESBL, se ha visto como sustituciones de aminoácidos en el centro activo de la enzima pueden dar lugar a una menor afinidad de esta para ciertos antibióticos (Jacoby, 1997). Esto podría explicar por qué presentan resistencia a ciertos  $\beta$ -lactámicos usados y no a todos.

Analizando los resultados según el origen, para las cepas aisladas de huevos convencionales los genes que se observaron con mayor frecuencia fueron *TEM* y *tetA* (41,18% ambos). En segundo lugar, el gen *tetB* se detectó en el 29,41% de las cepas y *CMY-2* en un 17,65%. Los genes *SHV* y *tetC* no se encontraron en ninguna cepa de huevos convencionales.

Por lo que respecta a los huevos domésticos, *TEM* y *tetB* fueron también los genes predominantes, con prevalencias del 52% y 44%, respectivamente. El gen *tetA* se detectó en el 16% de las cepas, los genes *CMY-2* y *tetC* en el 12% y el gen *SHV* en el 4% de las cepas.

Por último, en las cepas provenientes de huevos ecológicos, a diferencia de los otros orígenes, el gen más prevalente fue *tetA* (82,76%), seguido de *TEM* (42,28%), *tetB* (34,48%) y *CMY-2* (30,03%). El gen *tetC* se detectó en el 17,24% de las cepas, mientras que el gen *SHV* no se detectó.

El elevado número de cepas portadoras del gen *TEM* está en concordancia con numerosos estudios epidemiológicos (Jacoby & Bush, 2005). En un estudio realizado en España por Egea *et al.* (2011) en el que se monitorizó la presencia de los genes de ESBL *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-9* y *SHV* en *E. coli* aisladas de cáscaras de huevos convencionales, no se observó la presencia de ESBL, a diferencia de en nuestro estudio, aunque esto puede ser debido a la gran variedad de familias que conforman esta clase de enzimas. De hecho, en nuestro estudio no buscamos ningún gen de la familia *blaCTX*.

En este trabajo, el gen *SHV* solo se detectó en una cepa, lo que puede indicar una baja distribución de este gen respecto a otros genes de ESBL. En nuestro estudio también se ha detectado la presencia de cepas con  $\beta$ -lactamasas del tipo AmpC (*CMY-2*). De hecho, el gen *CMY-2*, considerado como la  $\beta$ -lactamasa AmpC mediada por plásmido más común (Jacoby, 2009), ha sido asociado con otros genes de resistencia, tales como *TEM*, *tetB* y en menor frecuencia *tetC*. Esto puede explicar por qué no se han observado cepas que tan solo presentaran el gen *CMY-2*. De hecho, los plásmidos que albergan genes de  $\beta$ -lactamasas AmpC a menudo contienen también genes de resistencia para diferentes clases de antimicrobianos, como quinolonas y tetraciclinas (Jacoby, 2009), así como genes para  $\beta$ -lactamasas ESBL, como *TEM-1*, *PSE-1* (Alvarez *et al.*, 2004) y *SHV* (Hanson *et al.*, 1999).

La asociación de diferentes genes en un mismo elemento genético puede explicar la presencia del elevado número de cepas con más de un gen de resistencia (62,52% en huevos orgánicos, 40% en domésticos y 41,18% en convencionales). Algunos estudios (Cantón & Coque, 2006) muestran como la mayoría de las cepas con presencia de genes para ESBL, particularmente aquellas con genotipos *TEM*, *SHV* y *CTX-M*, exhiben corresponsencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfonamidas lo que podría explicar la elevada presencia de los genes *TEM* y *tetA* observada en este estudio.

Los huevos en los que se observó una mayor diversidad en el patrón de genes detectados fueron los domésticos, con 9 patrones diferentes. En los ecológicos se observaron 5 patrones y en los convencionales solo 3. Estos datos hacen pensar que un mayor contacto con el ambiente exterior influye en mayor medida en la microbiota intestinal de las gallinas, dando lugar a una mayor heterogeneidad en los patrones observados, tanto genotípicamente como fenotípicamente. Por el contrario, en las cepas aisladas de gallinas criadas en sistemas convencionales, donde el ambiente está más controlado, los resultados han sido más homogéneos. De hecho, autores como Evans *et al.* (2017) indican que el microbioma de las aves depende sin lugar a duda de sus hábitos alimentarios, que determinan su exposición a diferentes grupos bacterianos.

3.2.5. Caracterización del riesgo

En la Tabla 4 pueden verse los resultados obtenidos de la combinación de los componentes “caracterización del peligro” y “evaluación de la exposición”. “Caracterización del peligro” varía entre 2 y 3. Esto se debe a que para el estudio solo se han considerado los antibióticos de mayor importancia para la salud humana. En el caso de la “evaluación de la exposición” se han tomado valores entre 2 y 6.

Origen	Antibiótico	Caracterización del peligro	Valoración de la exposición	% valor	Caracterización del riesgo
<b><i>E. coli</i></b>					
Doméstico	AMC	3	64	5	15
	AMP	3	8	2	6
	KF	3	24	4	12
	NA	3	20	3	9
	TE	2	20	3	6
Ecológico	AMC	3	58.6	5	15
	AMP	3	34.5	4	12
	C	2	17.2	3	6
	CIP	3	34.5	4	12
	CN	3	17.2	3	9
	KF	3	3.4	2	6
	NA	3	34.5	4	12
	S	3	17.2	3	9
	TE	2	51.7	5	10
Convencional	AMC	3	70.6	6	18
	AMP	3	11.8	3	9
	CRO	3	11.8	3	9
	KF	3	11.8	3	9
	TE	2	41.2	4	8
<b><i>Salmonella</i></b>					
Standard	AMC	3	5.9	2	6
	CIP	3	5.9	2	6

Tabla 4. Caracterización del riesgo de las resistencias a antimicrobianos de cepas de *E. coli* y *Salmonella* aisladas de huevos domésticos, ecológicos y convencionales. “Sin riesgo adicional”: valor = 0; “Algo de riesgo adicional”: valor entre 1-6; “Elevado riesgo adicional”: valor entre 7-12; “Riesgo adicional muy elevado”: valor entre 13-18

Entre los resultados obtenidos en la caracterización del riesgo resaltan tres casos como “riesgo adicional muy elevado”, uno en cada sistema de producción, y todos ellos debido a AMC. En el resto de los casos, el riesgo por resistencias se clasificó como “riesgo adicional elevado” para dos casos de huevos de producción doméstica (KF y NA); seis casos en el sistema de producción ecológica (AMP, CIP, CN, NA, S, TE) y cuatro casos en el sistema de producción convencional (AMP, CRO, KF, TE).

El mayor valor de riesgo se ha observado en los huevos convencionales, donde se ha obtenido un valor de 18 para la AMC. Tanto en huevos ecológicos como domésticos el valor obtenido para la AMC fue de 15, situándose en el mismo rango que en el de convencionales (“Riesgo adicional muy elevado”). No obstante, atendiendo al origen de los huevos, son los huevos ecológicos los que presentan un mayor riesgo, puesto que para este origen se ha observado un mayor número de casos con una caracterización del riesgo elevado (AMP, CIP, CN, NA, S y TE) o

muy elevado (AMC). Tras los ecológicos se encuentran los huevos convencionales, con una caracterización del riesgo muy elevada para la AMC y elevada para AMP, CRO, KF y TE. Por último, en el caso de los huevos domésticos, no se observó un riesgo demasiado importante, observándose una caracterización del mismo muy elevada para AMC y elevada para KF y NA.

Teniendo en cuenta que el riesgo es la relación entre la probabilidad de exposición a un peligro (en este caso, las resistencias a antibióticos) y la gravedad de dicho peligro, la caracterización del riesgo en base a las resistencias a los antibióticos en productos alimentarios (huevos en nuestro caso) puede ser de utilidad para analizar objetivamente el riesgo para el consumidor que presentan las resistencias a antibióticos observadas en las bacterias aisladas de alimentos, puesto que no todos los antibióticos tienen la misma importancia en la práctica clínica.

Hasta donde hemos podido saber, hemos sido de los primeros en incorporar una clasificación del riesgo basada en las resistencias a los antibióticos, observadas en huevos originarios de distintos sistemas de producción, con el fin de obtener datos que permitan conocer mejor los posibles riesgos asociados a los productos que llegan al consumidor procedentes de distintos sistemas de producción animal.

## 4. Capítulo 2. Resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de gallinas de un día de vida y efecto de un tratamiento de amoxicilina durante su crecimiento

Jiménez-Belenguer A., Doménech E., Villagrà A., Fenollar A. & Ferrús M. A. (2016) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. *Avian Pathology*, 45:4, 501-507

### 4.1. Materiales y métodos

#### 4.1.1. Cría de las gallinas

Se obtuvieron 22 gallinas de 1 día de vida de la estirpe Ross procedentes del mismo criadero comercial. Las gallinas se etiquetaron y se asignaron de forma aleatoria a 6 grupos de 3 gallinas cada uno y un grupo de 4 gallinas. Los animales se mantuvieron en el Centro de Investigación Tecnológica Animal en Segorbe (Castellón, España). Para evitar la transmisión de bacterias entre los diferentes grupos, los distintos corrales se separaron mediante barreras sólidas. En todos los corrales había 3 bebederos y el suelo estaba cubierto con 10 cm de virutas de madera. Las gallinas se alimentaron con el mismo pienso libre de antibióticos. Todo el estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Comisión Europea (CE) (European Parliament & Council of the European Union, 2010), con relación a la protección de los animales usados para experimentación y otros fines científicos.

#### 4.1.2. Administración del antibiótico

El grupo formado por 4 gallinas se consideró como control y no fue tratado. Los 6 grupos restantes fueron tratados con amoxicilina (Neudiaval oral powder (50 x 118 g), Laboratory Mevet, Lérida, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las gallinas se mantuvieron en las instalaciones experimentales desde el día de llegada (día 0) hasta el día del sacrificio (día 42). Las gallinas se pesaron y se trataron con diferentes dosis (D) de amoxicilina: D1: 24 mg amoxicilina/kg de animal; D2: 12 mg de amoxicilina/kg de animal y D3: 8 mg amoxicilina/kg de animal. Cada dosis se administró a dos grupos diferentes mediante jeringa oral. Los diferentes tratamientos (T) se administraron durante 3 días. El T1 empezó el día 7, el T2 el día 21 y el T3 comenzó el día 35 del ciclo de vida de las gallinas. No se administró otro tratamiento antimicrobiano durante el experimento.

#### 4.1.3. Recolección de las muestras

Se llevaron a cabo 4 recogidas de muestras durante el periodo experimental. El primer muestreo tuvo lugar en el día 0 y consistió en los meconios, que se obtuvieron de forma directa por presión abdominal de los pollitos. El segundo y tercer muestreo se realizaron los días 21 y 35 respectivamente, y las muestras se tomaron directamente de la cloaca de cada gallina mediante hisopos (Deltalab Collection and transport system, Amies swab ps+viscose). El muestreo final fue el día 49 y las muestras se tomaron directamente del ciego, tras el sacrificio de los animales mediante sobredosis de embutramida. En todos los casos, las muestras se mantuvieron bajo refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio.

#### 4.1.4. Aislamiento de *Escherichia coli*

Se realizaron diluciones decimales seriadas de cada una de las muestras y se inocularon placas de agar TBX (OXOID Ltd., Inglaterra, UK) con 0,1 mL, que a continuación se incubaron a 44°C durante 24 horas. Posteriormente, de cada placa se seleccionaron de forma aleatoria 2 colonias sospechosas de ser *E. coli* y se inocularon en placas de Plate Count (PC, Scharlau, Barcelona, España) que se incubaron durante 24 horas a 37°C. Los aislados se identificaron posteriormente mediante el sistema API-20 E (Biomérieux, Francia). Las colonias identificadas como *E. coli* se seleccionaron para la realización de los antibiogramas. Se seleccionaron 2 cepas de *E. coli* por cada ave y grupo en cada uno de los muestreos. En el primer muestreo se obtuvieron 28 aislados. En todos los muestreos siguientes se obtuvieron un total de 44 aislados en cada uno, a excepción del último muestreo donde se obtuvieron 42, como consecuencia del sacrificio anterior al muestreo de un ave por causas veterinarias.

#### 4.1.5. Test de sensibilidad antimicrobiana

La determinación de la sensibilidad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la técnica de difusión de disco (Antimicrobial Susceptibility Test Disc, OXOID Ltd., Inglaterra, UK) en placas de agar Mueller Hinton (BBLTM Mueller-Hinton II Agar, BD). Los niveles de resistencia se determinaron de acuerdo con las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Las cepas de *E. coli* se testaron frente a 12 antibióticos de importancia veterinaria y sanitaria: gentamicina (CN) 10 µg, amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 3 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, amikacina (AK) 30 µg, kanamicina (K) 30 µg, Cloranfenicol (C) 30 µg, cefalotina (KF) 30 µg, ciprofloxacino (CIP) 5 µg, ceftriaxona (CRO) 30 µg, tetraciclina (TE) 30 µg, ácido nalidíxico (NA) 30 µg y estreptomina (S) 10 µg.

#### 4.1.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos se realizaron mediante el programa informático Statgraphics Centurion XVI.II (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia). La posible relación entre los tratamientos con amoxicilina y el incremento de resistencias a diferentes

grupos de antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas se analizó mediante un Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA) (Greenacre, 2007), tal como se describe en el Apartado 2.2.2. Las proporciones relativas se compararon usando el test de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y el test de Fisher. También se realizó una comparación de medias. Un valor de probabilidad menor del 5% se consideró significativo.

## 4.2. Resultados y discusión

### 4.2.1. Resistencias en gallinas de un día de vida

Se observaron resistencias en un 63,3% de las cepas aisladas de los meconios de gallinas de 1 día de vida (14 de 22) y multirresistencia, definida como la resistencia a al menos 3 clases diferentes de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012), en el 95% de las cepas resistentes (13 de 14). La mayor prevalencia de resistencias se observó para NA (80%), AMP y AMC (70% ambos), seguido de TE (30%), KF (23,3%) y CIP (16,7%). Se observaron resistencias inferiores al 10% para S, CN y K. Finalmente, en ninguno de los aislados de *E. coli* se observaron resistencias a AK, C o CRO (Figura 3). En otros estudios se encontraron resultados similares, como en el caso de Martins da Costa *et al.* (2009), quienes no encontraron cepas de *E. coli* resistentes a C, pero sí observaron cepas provenientes de gallinas de 1 día de vida resistentes a AMP, KF, TE, S, CN y enrofloxacin (Figura 3).

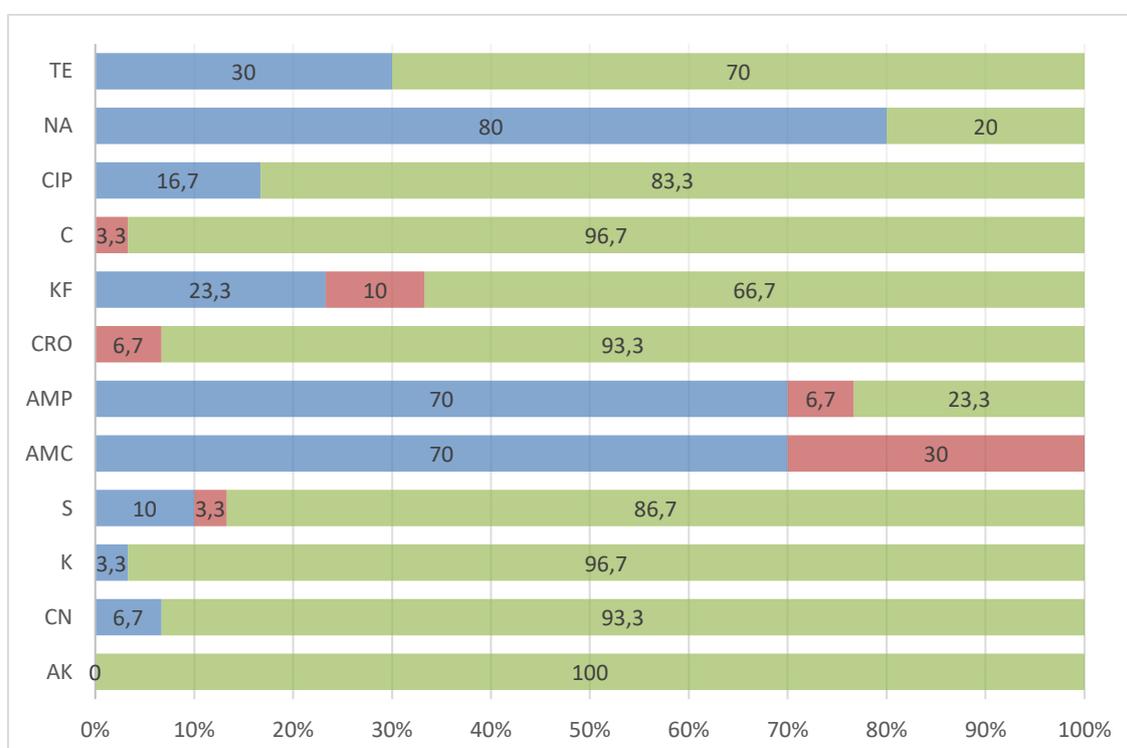


Figura 3. Porcentaje de *E. coli* resistente (azul), intermedio (rojo) y sensible (verde) aisladas de los meconios.

Debido a que las gallinas usadas para este estudio no fueron expuestas a antibióticos previamente, la principal causa de la presencia de cepas resistentes es muy probablemente la transmisión vertical desde los progenitores. Otros estudios (Giovanardi *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006; Bortolaia *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2014) han visto que es posible la transmisión vertical de resistencias desde los progenitores a la descendencia y su posterior distribución en la pirámide de producción, y sugieren que los progenitores representan un gran reservorio de bacterias desde el cual se puede dar la transmisión de las resistencias, mediante la contaminación de la cáscara del huevo por cepas resistentes durante la puesta. Otros autores (Bortolaia *et al.*, 2010) también observaron la transmisión vertical de cepas de *E. coli* resistentes a AMP y NA a través del sistema de producción de pollos de engorde. Estos autores concluyeron que los clones que se encontraban en los progenitores y en los grupos de pollos de engorde eran indistinguibles, lo que indicaba una transmisión vertical de cepas resistentes de *E. coli* desde los progenitores a la descendencia. Bortolaia *et al.* (2010) propusieron que las resistencias a  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas en *E. coli* se deben a la transmisión vertical a través de las gallinas parentales. En otros estudios, como el llevado a cabo por Baron *et al.* (2014), se sugiere que las cepas de *E. coli* resistentes pueden ser introducidas en las instalaciones de cría, bien mediante la transmisión vertical, cuando los grupos de aves parentales están contaminados por cepas resistentes, o bien por contaminación temprana en el criadero mismo o durante el transporte, un período en el que la microbiota digestiva está inmadura y es probablemente muy receptiva a una colonización inicial, aunque no puedan ser excluidos otros posibles eventos contaminantes que se puedan dar durante las etapas posteriores en las granjas de producción.

Otra posible causa de estos resultados podría ser la contaminación ambiental del criadero (Dierikx *et al.*, 2013). Aunque Dhillon & Jack (1996) propusieron que la expansión de *E. coli* entre las gallinas de 1 día de vida en explotaciones comerciales se daba principalmente por transmisión horizontal, en este estudio la exposición ambiental a antibióticos fue limitada por las condiciones de la granja experimental, donde las gallinas se mantuvieron en corrales higiénicos, reduciendo así al máximo la posible expansión ambiental de las resistencias.

Así, considerando lo anterior, el aislamiento de cepas resistentes en gallinas de 1 día de vida sería debida posiblemente a una combinación, tanto de transferencia vertical desde los progenitores, como de una transferencia horizontal entre las propias gallinas.

#### 4.2.2. Cambios en los patrones de resistencia durante los tratamientos experimentales con amoxicilina

Durante el período de crecimiento se administraron 3 tratamientos con amoxicilina. Los resultados de resistencias de las cepas de *E. coli* aisladas de los diferentes grupos sometidos a tratamiento antibiótico no mostraron diferencias significativas entre ellos (P-valor 0,1760). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre las cepas del grupo control y los grupos tratados (P-valor 0,0013). Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de las 3 dosis diferentes de amoxicilina (P-valor 0,9025), los datos de estos grupos se trataron de forma conjunta.

En la Figura 4 se puede observar el Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA) que se llevó a cabo para la evaluación global del efecto de cada tratamiento de amoxicilina en el perfil de sensibilidad (sensible, intermedio y resistente) de las cepas de *E. coli* para cada antibiótico testado. Considerando el eje X, “resistencia” y “resistencia intermedia” de *E. coli* a los antibióticos se posicionan en la izquierda; sin embargo, “sensibilidad a los antibióticos” se posiciona en la derecha. Asimismo, considerando que cuanto más cerca la posición, más estrecha es la relación, los resultados muestran que las muestras control presentaban un elevado porcentaje de cepas sensibles a los antibióticos y que las cepas obtenidas de los pollos tratados tenían un elevado porcentaje de resistencias.

Los antibióticos más relacionados con resistencias fueron AMP, AMC y KF, sugiriendo que, aunque solo se usó un antibiótico como tratamiento, este pudo influir en la selección de resistencias a otros  $\beta$ -lactámicos. En la parte derecha de la Figura 4, donde se representa una elevada sensibilidad antibiótica, se sitúan CRO, K, CN CIP, y AK.

Considerando el eje Y se pueden observar pocas diferencias. La elevada distancia de repuesta intermedia indica un bajo porcentaje de resistencia intermedia.

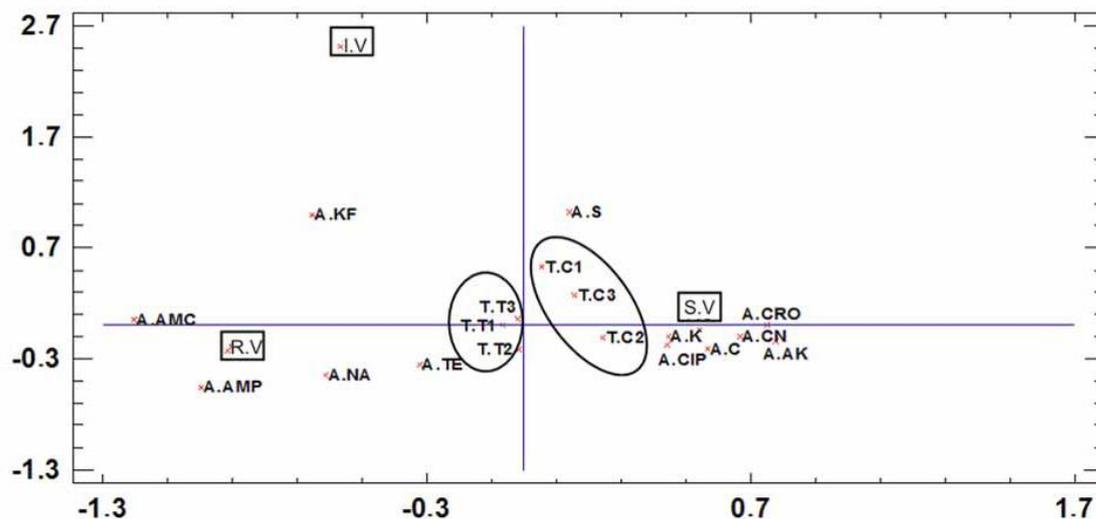


Figura 4. MCA bi-plot. Antibióticos testados: A.KF = cefalotina; A.AMC = amoxicilina-clavulánico; A.AMP = ampicilina; A.NA = ácido nalidíxico; A.TE = tetraciclina; A.S = estreptomicina; A.K = kanamicina; A.CIP = ciprofloxacino; A.C = cloranfenicol; A.CN = gentamicina; A.CRO = ceftriaxona; A.AK = amikacina. Antes de la administración de cualquier dosis (T.C0), después de la administración de las tres dosis (T.T1, T.T2 y T.T3), y para el mismo muestreo en el grupo control (T.C1, T.C2, T.C3). R.V= (valores resistentes), I.V=(valores intermedios), S.V=(valores sensibles).

La Tabla 5 muestra el porcentaje de cepas de *E. coli* resistentes (R), intermedias (I) y sensibles (Sn) que se obtuvieron, tanto en los controles como tras los tratamientos, para  $\beta$ -lactámicos (AMC, AMP, CRO y KF), aminoglucósidos (AK, CN, K y S), cloranfenicol (C), quinolonas (NA y CIP) y tetraciclina (TE). No se aisló ninguna cepa de *E. coli* resistente a AK o CRO ni del grupo control ni de los sometidos a tratamiento. Otros autores (Sáenz *et al.*, 2001; Bywater *et al.*, 2004) hallaron resultados parecidos. Teniendo en cuenta la importancia crítica de la CRO en medicina

humana (WHO Advisory Group on Integrated Surveillance, 2013; Doménech *et al.*, 2015) estos resultados son favorables.

En el caso de las quinolonas, se encontraron escasas diferencias en las resistencias observadas para NA y CIP entre los grupos control y los sometidos a tratamiento. Por otra parte, las resistencias a CIP en el grupo de aves no expuestas a antibióticos mostraron unos cambios interesantes en el tiempo: no se encontraron cepas resistentes en el grupo C1, correspondiente al día 7 del ciclo de vida; sin embargo, aparecen cepas resistentes en C2 y C3. En un estudio previo, Apajalahti *et al.* (2004) informaron de que la composición microbiológica del intestino de los pollos puede cambiar en función de la dieta y el ambiente, actuando directamente, como una fuente continua de bacterias, o indirectamente, mediante la influencia en el sistema inmunitario de las aves. En general, un gran número de aves portadoras de cepas de *E. coli* resistentes eliminan al exterior un gran número de bacterias resistentes, lo que resulta en una rápida contaminación de los otros individuos del mismo grupo y de los que comparten ambiente en el mismo edificio de producción. Este elevado nivel de contaminación es probablemente difícil de eliminar incluso aplicando estrictos mecanismos de desinfección, particularmente en granjas con áreas al aire libre (Baron, *et al.*, 2014).

	TE	S	K	CN	AK	NA	CIP	C	KF	CRO	AMP	AMC
CONTROL 1 (Sn)	70	87,5	100	100	100	13	88,89	100	12,5	100	11	12,5
CONTROL 1 (I)	0	12,5	0	0	0	0	11,1	0	62,5	0	0	0
CONTROL 1 (R)	30	0	0	0	0	87	0	0	25	0	89	87,5
TRATAMIENTO 1 (Sn)	63,89	44,44	72,22	100	100	27,78	88,89	86,11	16,67	100	0	0
TRATAMIENTO 1 (I)	0	22,22	0	0	0	0	0	0	19,44	0	5	5,56
TRATAMIENTO 1 (R)	36,11	33,33	27,78	0	0	72,22	11,11	13,89	63,89	0	95	94,44
CONTROL 2 (Sn)	62,5	87,5	100	100	100	37,5	75	100	62,5	100	50	12,5
CONTROL 2 (I)	0	12,5	0	0	0	0	0	0	12,5	0	0	0
CONTROL 2 (R)	37,5	0	0	0	0	62,5	25	0	25	0	50	87,5
TRATAMIENTO 2 (Sn)	41,67	69,44	77,78	0	100	36,11	83,33	91,67	33,33	94,44	13,89	5,56
TRATAMIENTO 2 (I)	0	2,78	2,78	0	0	0	0	0	0	5,56	2,78	5,56
TRATAMIENTO 2 (R)	58,33	27,78	19,44	0	0	63,89	16,67	8,33	66,67	0	83,33	88,89
CONTROL 3 (Sn)	75	75	100	100	100	75	100	75	62,5	100	62,5	12,5
CONTROL 3 (I)	0	25	0	0	0	12,5	0	0	25	0	0	0
CONTROL 3 (R)	25	0	0	0	0	12,5	0	25	12,5	0	37,5	87,5
TRATAMIENTO 3 (Sn)	32,35	73,53	91,18	88,24	100	55,88	79,41	91,18	20,59	100	11,76	0
TRATAMIENTO 3 (I)	0,00	14,71	2,94	2,94	0	2,94	0	0	17,65	0	0	17,65
TRATAMIENTO 3 (R)	67,65	11,76	5,88	5,88	0	41,18	20,59	8,82	61,76	0	88,24	82,35

Tabla 5. Porcentaje de *E. coli* resistente (R), intermedio (I) y sensible (Sn).

En este trabajo, las resistencias a NA en los pollos tratados fue del 64±8,2%. La tasa de resistencia en *E. coli* aportada por EFSA (EFSA & ECDC, 2013) varía considerablemente entre países y va desde un 0,6% (n=316) en Finlandia hasta un 85,1% (n=101) en España. En relación con CIP, los resultados mostraron una tasa de resistencia del 16,1±4,8%, siendo más elevada

que la tasa del 9% encontrada en Dinamarca (n=134), pero menor que la media de la tasa en Europa que se sitúa en el 53,1% (n=1703) (EFSA & ECDC, 2013). Las resistencias de *E. coli* a AMP, KF, todos los aminoglucósidos estudiados, C y TE, mostraron elevadas diferencias entre los grupos tratados y el grupo control. Tan solo en los animales sometidos a tratamiento se observaron resistencias a CN, K, S y C.

Miller *et al.* (2004) mostraron que la exposición a  $\beta$ -lactámicos inducía el operón *dpiBA*, el cual inhibe la replicación del cromosoma bacteriano, induciendo la respuesta SOS, lo que a su vez induce un incremento en la variabilidad genética. Estos factores podrían explicar las tasas de resistencia generalmente más elevadas que se observaron en los grupos tratados frente al grupo control.

La tasa más elevada de resistencia para TE que se obtuvo en el estudio fue de 67,6%, aunque el valor medio fue de 37,4%. Estos valores son relativamente bajos en comparación con el 75% de resistencia comunicado por Sáenz *et al.* (2001). Sin embargo, el valor medio en Europa suministrado por EFSA & ECDC (2013) es del 45,2% (n=2019).

En relación a la relevancia de estos resultados para la salud pública, hay que destacar que la amoxicilina, ampicilina y el ácido nalidíxico están incluidos en la Lista de Antimicrobianos de Importancia Crítica publicada por el “WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance” (2013), ya que cumplen el criterio 1 (el agente antimicrobiano es el único, o uno de los únicos terapéuticos disponibles, para el tratamiento de enfermedades humanas graves) y también el criterio 2 (el agente antimicrobiano se usa para el tratamiento de enfermedades causadas por: a) organismos que pueden ser transmitidos a humanos a través de fuentes no humanas, b) enfermedades humanas causadas por organismos que pueden adquirir genes de resistencia a través de fuentes no humanas). Por consiguiente, el incremento de las resistencias a antibióticos en general y la resistencia a estos antibióticos en particular, pueden representar una amenaza importante a la salud humana (European Commission, 2010).

## 5. Capítulo 3. Estudio de las resistencias a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de gallinas reproductoras en granjas avícolas

Este estudio se realizó en explotaciones avícolas comerciales, tanto sobre manadas de gallinas de cría (fase I), correspondientes a gallinas de 1 día de vida y pollitas, como en manadas de gallinas reproductoras adultas (fase II).

### 5.1. Prevalencia de resistencias a antibióticos y de algunos de los principales genes asociados a la resistencia a cefalosporinas y quinolonas durante el crecimiento de gallinas reproductoras

#### 5.1.1. Materiales y métodos

##### 5.1.1.1. Protocolo de muestreo

El diseño del plan de muestreo se basó en el “Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*” (SANCO, 2016). Las muestras se tomaron de una granja de manadas de cría (gallinas jóvenes que aún no están en fase de producción). La explotación de la granja estaba compuesta por 34.170 hembras y 5.125 machos. De esta explotación se muestreó la parte correspondiente a las gallinas de cría, que consistía en una nave de 14.500 hembras.

Se realizaron 5 muestreos, siendo el primero el correspondiente a las gallinas de 1 día de vida, el segundo a las 4 semanas de edad, el tercero a las 19 semanas, el cuarto a las 25 semanas y el quinto a las 28 semanas de edad.

Las muestras consistieron en meconios y fondos de las cajas de transporte de las pollitas de 1 día de vida. Para el resto de los muestreos se analizaron un par de calzas absorbentes impregnadas con el lecho de la nave muestreada y dos muestras compuestas de heces (de al menos 150 g cada una) por cada lote y por cada muestreo (Tabla 6). Las muestras se tomaron en base a las indicaciones del “Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*” (SANCO, 2016), con el fin de asegurar que las muestras fuesen representativas de toda la manada de gallinas.

A las aves se les administraron 2 tratamientos antibióticos por parte de veterinarios autorizados, durante la duración del estudio (Tabla 6), para el tratamiento de diversas enfermedades: Se les administró tilosina (macrólido) durante un período de 5 días y amoxicilina ( $\beta$ -lactámico) durante 4 días.

Muestreo	Fecha	Edad aves	Tipo de muestra	Tratamientos
1	20-24 /06/16	1 día	Meconios y fondos de caja de transporte	
2	11-17/07/16	4 semanas (Pollitas)	Heces y calzas	tilosina (8/07/16 al 12/07/16) 5 días
3	24-28/10/16	19 semanas (Pollitas)	Heces y calzas	
4	5-9/11/16	25 semanas (Adultas)	Heces y calzas	amoxicilina (11/10/16 al 14/10/16) 4 días
5	26/30/16	28 semanas (Adultas)	Heces y calzas	

Tabla 6. Muestreos, edad de las aves, tipo de muestra por muestreo y tratamientos aplicados a las gallinas.

#### 5.1.1.2. Preparación inicial de las muestras

Las calzas se sumergieron en 225 mL de agua de peptona tamponada (Scharlau, España) y se homogeneizaron en Stomacher (BagMixer, Interscience, Francia).

En el caso de los meconios, debido a que la cantidad de muestra que se podía conseguir a partir de cada una de las pollitas de 1 día era inferior a 25 g, se les añadió la cantidad de agua de peptona tamponada necesaria para llegar a una dilución 1:10. Además, se cogieron 25 g de meconios de los fondos de cajas de transporte y se diluyeron en 225 mL de agua de peptona tamponada. Posteriormente se homogeneizaron en Stomacher.

De cada una de las muestras de heces se tomaron 2 submuestras de 25 g cada una, que se diluyeron en 225 mL de agua de peptona tamponada y se homogeneizaron en Stomacher.

#### 5.1.1.3. Aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli*

Una vez homogeneizadas las muestras, se realizaron diluciones decimales seriadas y se inocularon 100µL en la superficie de 4 placas de Microinstant Chromogenic Coliforms Agar (Scharlau, España), medio cromógeno selectivo y diferencial para coliformes y *E. coli*. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Tras la incubación, se seleccionaron de forma aleatoria colonias con la morfología típica de *E. coli*. Se fijó un mínimo de 30 cepas y un máximo de 40 cepas por muestreo.

Las colonias aisladas se cultivaron en el medio nutritivo Plate Count (PCA, Scharlau, España) durante 24 h a 37°C. Tras la incubación, se inocularon tubos con caldo de triptófano (DEV Tryptophan Broth, Merck, Alemania) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Se comprobó si había habido producción de indol añadiendo unas gotas de reactivo de Kovacs (PanReac AppliChem, España). Las cepas positivas se seleccionaron, se subcultivaron en PCA y se mantuvieron a 4°C para análisis posteriores. Además, las cepas provenientes del muestreo 1 y todas aquellas destinadas a análisis moleculares se congelaron a -21°C en crioviales (Pro-lab Diagnostics Microbank™).

#### 5.1.1.4. *Antibiogramas*

Se comprobó la sensibilidad a diferentes antibióticos de todas las cepas de *E. coli* aisladas. Para ello se empleó la técnica de difusión en disco siguiendo las indicaciones del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2014), tal como se describe en apartados anteriores. Las placas se incubaron a 37°C durante 18h.

La elección de los antibióticos se hizo en base a las indicaciones de EFSA (2008) para la monitorización de resistencias a antibióticos en cepas comensales de *E. coli* aisladas de animales. Los antibióticos usados fueron: cefotaxima (CTX) 30 µg, ácido nalidíxico (NA) 30 µg, ciprofloxacino (CIP) 5 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, tetraciclina (TE) 30 µg, cloranfenicol (C) 30 µg, gentamicina (CN) 10 µg, estreptomina (S) 10 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg (Antimicrobial Susceptibility Test Disc, OXOID Ltd., Inglaterra, Reino Unido).

Se comprobó el fenotipo de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) siguiendo las indicaciones del CLSI (2014): Para las cepas que mostraron resistencia a CTX y/o CAZ, se comprobó mediante difusión en disco la resistencia a la combinación de cefotaxima-ácido clavulánico 40 µg (Liofilchem Diagnostici, Roseto degli Abruzzi, Italia) y ceftazidima-ácido clavulánico 40 µg (Liofilchem Diagnostici, Roseto degli Abruzzi, Italia). En este análisis, cuando se obtiene un diámetro del halo de inhibición igual o superior a 5 mm respecto al antibiótico sin la combinación con ácido clavulánico, se considera que la cepa tiene fenotipo ESBL.

#### 5.1.1.5. *Extracción de DNA*

La extracción de DNA se realizó mediante lisis térmica. Para ello, se resuspendieron 2-3 colonias procedentes de un cultivo puro de la cepa, incubado en PCA a 37°C durante 24h, en 150 µL de tampón TE 1X (AppliChem Panreac) en tubos eppendorf estériles e irradiados con luz UV durante 15 minutos.

La suspensión celular se incubó durante 10 minutos a 95°C en un bloque térmico. Posteriormente, los tubos se enfriaron con hielo durante 2 minutos y se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 8 minutos. Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf estéril e irradiado. El producto de la extracción se conservó a -21°C para su posterior utilización.

#### 5.1.1.6. *Detección de genes de resistencia a antibióticos en cepas de E. coli mediante PCR*

Se realizaron varias PCR múltiples (mPCR) para la detección de diferentes familias de genes de resistencia a antibióticos: Una para la detección de genes relacionados con resistencia a β-lactámicos (*SHV*, *TEM* y *CMY-2*) y otra para la detección de genes relacionados con resistencia a quinolonas (*qnrB* y *qnrS*), usando los iniciadores descritos en la Tabla 7.

Se analizaron todas aquellas cepas que presentaron resistencia o sensibilidad intermedia a CIP, CAZ y/o CTX, así como todas las cepas aisladas de meconios y fondos de caja. Estos dos tipos

de muestras se trataron igual, por lo que a partir de este momento se referirán solo como “meconios”.

Las condiciones usadas para detección de los genes *SHV*, *TEM* y *CMY-2* por mPCR fueron las descritas por Kozak *et al.* (2009) y las condiciones para la detección de los genes *qnrB* y *qnrS* fueron las descritas por Cattoir *et al.* (2007).

Iniciadores	Secuencia	Concentración iniciadores	Amplicón (bp)	Referencia
SHV-f	AGGATTGACTGCCTTTTTG	0,4 µM	393	Colom <i>et al.</i> , 2003
SHV-r	ATTTGCTGATTCGCTCG	0,4 µM		
TEM-f	TTAACTGGCGAACTACTTAC	0,2 µM	247	Kozak <i>et al.</i> , 2009
TEM-r	GTCTATTTTCGTTTCATCCATA	0,2 µM		
CMY-2-f	GACAGCCTCTTTCTCCACA	0,2 µM	1000	
CMY-2-r	TGGACACGAAGGCTACGTA	0,2 µM		
qnrB-f	GGMATHGAAATTCGCCACTG	0,2 µM	264	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
qnrB-r	TTTGCYGYCCAGTCGAA	0,2 µM		
qnrS-f	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	0,2 µM	428	
qnrS-r	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	0,2 µM		

Tabla 7. Iniciadores usados para la detección de genes de resistencia en *Escherichia coli*.

Las PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL con la siguiente concentración de los reactivos: 1x NH<sub>4</sub> Reaction Buffer (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline), 0,5 mM de cada dNTP (dNTP Mix 100mM, Bioline), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline), 1,25 U Taq-DNA polymerase (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline) y la concentración indicada por los autores de cada uno de los iniciadores.

#### 5.1.1.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software “Statgraphics Centurion XVII” (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia).

Las posibles diferencias significativas entre los resultados se determinaron mediante ANOVA y la prueba de múltiples rangos. En el caso de la ANOVA, se consideraron diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significación del 5% cuando el p-valor fue inferior a 0,05. Por su parte, para la prueba de múltiples rangos, el método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de confianza del 95%.

## 5.1.2. Resultados y discusión

## 5.1.2.1. Prevalencia de resistencias a antibióticos

Se aislaron un total de 383 cepas de *E. coli*: 68 a partir de meconios y los fondos de las cajas de transporte de las pollitas de 1 día de vida; 170 cepas a partir de muestras de heces, de las que 90 cepas se aislaron de las pollitas (durante las primeras 20 semanas de vida) y 80 cepas de las gallinas adultas (a partir de 20 semanas de vida) y 145 cepas a partir de las calzas, de las que 80 cepas se aislaron de las pollitas y 65 cepas de las gallinas adultas.

En la Tabla 8 se indican las prevalencias de resistencia a cada uno de los antibióticos testados, así como los casos para los que se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). A todas las cepas resistentes a CTX y/o CAZ se les comprobó el fenotipo ESBL. Todas ellas fueron positivas en dicha prueba.

En función de la prevalencia de las resistencias observadas, se clasificó el nivel de resistencia, basándose en los valores indicados por EFSA & ECDC (2018): esporádico  $< 0,1\%$ ; muy bajo  $0,1-1,0\%$ ; bajo  $> 1,0-10,0\%$ ; moderado  $> 10,0-20,0\%$ ; elevado  $> 20,0-50,0\%$ ; muy elevado  $50,0-70,0\%$ ; extremadamente elevado  $> 70,0\%$ .

	Meconios			Heces			Calzas		
	1 día de vida (N=68)	Pollitas (N=90)	Adultas (N=80)	Total (N=170)	Pollitas (N=80)	Adultas (N=65)	Total (N=145)		
<b>AMP</b> b, c, d	100% (n=68)	80% (n=72)	73,75% (n=59)	77,06% (n=131)	52,5% (n=42)	69,23% (n=45)	60% (n=87)		
<b>CTX</b> c	41,18% (n=28)	0% (n=0)	3,75% (n=3)	1,76% (n=3)	5% (n=4)	7,69% (n=5)	6,21% (n=9)		
<b>CAZ</b> a, c, d	10,29% (n=7)	0% (n=0)	2,5% (n=2)	1,18% (n=2)	1,25% (n=1)	1,54% (n=1)	1,38% (n=2)		
<b>CIP</b> d	0% (n=0)	0% (n=0)	2,5% (n=2)	1,18% (n=2)	2,5% (n=2)	1,54% (n=1)	2,07% (n=3)		
<b>NA</b> a, c, e	0% (n=0)	10% (n=9)	11,25% (n=9)	10,59% (n=18)	18,75% (n=15)	32,31% (n=21)	24,83% (n=36)		
<b>C</b> d	0% (n=0)	0% (n=0)	3,75% (n=3)	1,76% (n=3)	7,5% (n=6)	9,23% (n=6)	8,28% (n=12)		
<b>CN</b> b, c	57,35% (n=39)	2,22% (n=2)	0% (n=0)	1,18% (n=2)	8,75% (n=7)	0% (n=0)	4,83% (n=7)		
<b>S</b> a, b, c, e	66,18% (n=45)	7,78% (n=7)	40% (n=36)	22,94% (n=39)	5% (n=4)	20% (n=13)	11,72% (n=17)		
<b>TE</b> a, b, c, d	98,53% (n=67)	70% (n=63)	56,25% (n=45)	63,53% (n=108)	13,75% (n=11)	52,31% (n=34)	31,03% (n=45)		

Tabla 8. Prevalencia de resistencias en cepas de *E. coli* para los distintos orígenes. N (total de cepas para el origen); n (número de cepas resistentes). <sup>a</sup> diferencias significativa entre pollitas y adultas en heces; <sup>b</sup> diferencias significativa entre pollitas y adultas en calzas; <sup>c</sup> diferencias significativa entre 1 día de vida y pollitas; <sup>d</sup> diferencias significativa en pollitas entre heces y calzas; <sup>e</sup> diferencias significativas en adultas entre heces y calzas

Cabe destacar, debido a su importancia clínica en humanos, la elevada presencia de resistencias a cefalosporinas de 3ª generación, CTX y CAZ, del 41,18% y del 10,29%, respectivamente. Además, el porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia fue alto para estos dos antibióticos, siendo del 69,12% en el caso de la CAZ y del 51,47% en la CTX. Otros autores han detectado resistencia a cefalosporinas de tercera generación en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de aves, tanto de 1 día de vida (Baron *et al.*, 2014) como durante la primera semana (Dame-Korevaar *et al.*, 2017). No obstante, en general, los estudios que se han hecho han usado un enriquecimiento selectivo con cefalosporinas (CTX generalmente) como paso previo al aislamiento de cepas, por lo que los datos no son comparables a los obtenidos en nuestro estudio, en el cual no se usó ningún paso previo de selección.

La baja sensibilidad a estos antibióticos, teniendo en cuenta que su uso no está extendido en medicina veterinaria, hace suponer un posible uso de cefalosporinas en las incubadoras con la posible intención de reducir la mortalidad de las aves. De hecho, EFSA (2011) ya indicó que hay indicios de un uso *off-label* de ceftiofur en pollos de 1 día en las incubadoras de forma profiláctica, a pesar de que en la actualidad el uso de cefalosporinas en pollos no está autorizado en la UE.

La presencia de cepas resistentes a diversos antibióticos, tanto en los meconios como en los fondos de las cajas de transporte de las pollitas de 1 día de vida, es probablemente debida a dos factores: a) la transmisión vertical desde los progenitores a la descendencia, bien por una infección en el útero de la gallina durante la formación del huevo o bien por contaminación desde restos fecales de la cloaca de la gallina en el momento de la puesta del huevo, y b) la transmisión en las incubadoras. Un estudio realizado por (Zurfluh *et al.*, 2014) demostró la presencia de plásmidos genéticamente similares en cepas de *E. coli* productoras de ESBL aisladas en diferentes puntos de la pirámide de producción, sugiriendo que debían provenir de una fuente común. En otro estudio realizado en Suecia, Nilsson *et al.* (2014) detectaron la presencia de un clon de *E. coli* presente en todos los niveles de la pirámide de producción, sugiriendo también su transmisión desde los progenitores a su descendencia. Projahn *et al.* (2017) caracterizaron mediante PFGE cepas de *E. coli* aisladas de la cáscara de los huevos, que estaban relacionadas con cepas aisladas de las manadas parentales correspondientes. Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que las crías infectadas podrían introducir cepas resistentes en las incubadoras, y que estas actuarían a su vez como vectores de expansión. Además, como han mostrado otros autores (Baron *et al.*, 2016), estas cepas tienen una gran capacidad para colonizar y persistir en las gallinas.

Las elevadas tasas de resistencias detectadas hacen pensar que las pollitas de 1 día de vida pueden introducir en el ambiente de las granjas cepas resistentes a una elevada variedad de antibióticos. Es especialmente preocupante la alta tasa de resistencias a cefalosporinas, presentes en las gallinas desde el primer momento. La presencia de estas en las pollitas de 1 día de vida puede suponer la introducción de estas cepas resistentes en la manada de aves y su posterior transmisión a la descendencia de estas futuras gallinas reproductoras. Además, se debe tener en cuenta que la presencia de cepas resistentes en las granjas puede suponer una fuente de contaminación de cepas resistentes para los trabajadores de las explotaciones avícolas.

Por ello, es importante tomar las medidas higiénicas necesarias en las incubadoras para reducir en lo posible la posibilidad de la transmisión de las resistencias entre las granjas, además de evitar el uso de prácticas que puedan favorecer la selección de estas resistencias, como un uso innecesario de antibióticos, especialmente cefalosporinas.

**En cuanto en las cepas aisladas de heces**, tal y como se puede ver en la Tabla 8, la prevalencia de resistencias no fue elevada en general. Tan solo se observaron niveles extremadamente elevados para AMP (77,06%) y muy elevados para TE (63,53%). Los siguientes antibióticos con mayores tasas de resistencia fueron S, con un 22,94% y NA, con un 10,59%. Para el resto de los antibióticos testados se observó un nivel de resistencias inferior en todos los casos al 2%.

**En las cepas aisladas de heces de las pollitas** se observaron niveles extremadamente elevados para AMP (80%) y TE (70%) y solo se observaron resistencias en niveles bajos para NA (10%), S (7,78%) y CN (2,22%). Para el resto de los antibióticos no se aislaron cepas resistentes.

**Respecto a las cepas aisladas de heces de las gallinas en fase adulta**, se observaron resistencias a todos los antibióticos excepto a CN. Sin embargo, para la mayoría de los antibióticos el porcentaje de resistencias fue bajo (inferior al 10%). El único antibiótico para el que se observó un nivel extremadamente elevado de resistencias fue AMP (73,75%). Los siguientes antibióticos con las mayores tasas de resistencias fueron TE, con un nivel muy elevado (56,25%) y CN, con un nivel elevado (40%). Para NA se observó un nivel moderado de resistencias (11,25%).

Al comparar nuestros datos con los datos aportados por el informe que elaboran EFSA y el ECDC sobre resistencias en alimentos, humanos y animales de consumo (EFSA & ECDC, 2018) se aprecia como el nivel de resistencias de nuestro estudio es inferior a los que se dan en el informe respecto al sector avícola (pollos de engorde), tanto a nivel europeo como en España: En Europa la mayoría de las resistencias observadas son para quinolonas, con un 64% para CIP y un 59,8% para NA, seguido de AMP con un 58% y TE con un 47,1%. La resistencia a C es moderada y la resistencia a CN es baja, al igual que para CTX y CAZ.

En el caso de las prevalencias en España, los valores se sitúan en general por encima de la media europea. Los antibióticos con el nivel más alto de resistencias son las quinolonas, con niveles extremadamente elevados, siendo del 91,2% en el caso de CIP y del 88,3% en NA. Les siguen AMP y TE, con valores ligeramente superiores al 60%, CN con un 35,7%, el C (17%) y CTX (9,4%) y CAZ (7,6%) con niveles bajos de resistencia, aunque superiores a lo observado en nuestro estudio.

Los bajos valores de resistencia a cefalosporinas, aunque inferiores en nuestro caso, concuerdan con el nivel reportado en el informe, mientras que la principal diferencia entre nuestros resultados y los del informe se dan principalmente en las quinolonas, donde para NA observamos valores aproximados del 10% y la resistencia a CIP fue esporádica.

En un estudio realizado en España con gallinas ponedoras (Moreno *et al.*, 2019) los niveles de resistencias coincidieron con lo observado en nuestro estudio, excepto en el caso de TE y AMP, donde el nivel de resistencias fue menor: los autores informaron de valores de resistencias en las pollitas del 21% para TE; inferiores al 20% para AMP, CIP y NA; del 10% para el C, del 5%

para la CN y de 3% para CTX y CAZ. Por su parte, en las gallinas ponedoras adultas la prevalencia de resistencias, como ocurría en nuestro estudio, fue inferior a la de las pollitas, mostrando una prevalencia para TE del 19,3%; del 13,7% para AMP e inferior al 5% para CIP, NA, C y CN, además de no obtener cepas resistentes a CTX ni CAZ.

Harisberger *et al.* (2011), en un estudio realizado en Suiza en distintos sistemas de gallinas ponedoras, observaron prevalencias inferiores a las de nuestro trabajo, excepto en el caso de NA y CIP, donde observaron un 16,7% de cepas resistentes. Las resistencias para AMP y TE fueron especialmente inferiores a las de nuestro estudio (11,1% y del 17,5% respectivamente). En el caso de los aminoglucósidos, al igual que nosotros, observaron una mayor prevalencia de resistencias para S que para CN. Además, no observaron cepas resistentes a cefalosporinas. En otro estudio realizado en Noruega, Kaspersen *et al.* (2018) observaron bajos niveles de resistencia a quinolonas en cepas de *E. coli* aisladas de heces y calzas, tanto de pollos de engorde (3,6%) como de ponedoras (0,5%).

La presencia de cepas con fenotipo ESBL/AmpC se ha observado tanto en granjas de pollos de engorde (Laube *et al.*, 2013) como en las manadas de gallinas parentales (Projahn *et al.*, 2017), mediante enriquecimiento previo de las muestras con cefotaxima o sin ello. Dierikx *et al.* (2013) en un estudio descriptivo en pollos de engorde en los Países Bajos, encontraron cepas de *E. coli* productoras de ESBL/AmpC en todos los niveles de la cadena de producción. Esto muestra cómo estas resistencias están extendidas en toda la pirámide de producción de gallinas, indistintamente del país estudiado.

A pesar de que, tanto en nuestro estudio como en los de otros autores, se han detectado cepas con sensibilidad reducida a cefalosporinas, la prevalencia entre la población de gallinas adultas es baja. Esto se corresponde con los datos reflejados en estudios de vigilancia de diferentes países europeos, donde se está observando un descenso en la prevalencia de estas cepas de *E. coli* con baja sensibilidad a cefalosporinas (Ceccarelli *et al.*, 2019).

En base a los datos obtenidos tanto en este estudio como en los observados por otros autores (Dierikx *et al.*, 2013; Laube *et al.*, 2013; Projahn *et al.*, 2017), es evidente la presencia de cepas productoras de ESBL/AmpC en todos los niveles de la pirámide de producción de gallinas. En caso de llegar al consumidor, estas cepas pueden suponer un riesgo para la salud pública. Por ello es necesario realizar más estudios enfocados a implementar medidas para la reducción o eliminación de estas resistencias en la producción primaria.

Por último, al analizar conjuntamente las **resistencias en las gallinas a lo largo de todas las edades**, se observa una disminución general del porcentaje de resistencias desde las gallinas de 1 día de vida hasta las gallinas adultas (Figura 5). Esto puede deberse en parte a que, al usarse de forma continuada tratamientos antibióticos, no se da una presión selectiva constante que favorezca su dispersión entre las poblaciones bacterianas. De hecho, tan solo se administraron 2 tratamientos, uno con tilosina (macrólido) durante 5 días a las pollitas y otro con amoxicilina ( $\beta$ -lactámico) a las gallinas adultas durante 4 días. Además, como ya demostraron otros autores (Lu *et al.*, 2003), en condiciones normales se producen cambios en la microbiota de las gallinas durante su crecimiento, en los que se pasa de unas poblaciones transitorias durante los primeros días, a unas poblaciones bacterianas más maduras a medida que las gallinas crecen. Este cambio normal en la microbiota, unido a la desaparición de la

posible presión selectiva inicial antibiótica, podría explicar la reducción de la frecuencia de resistencias observadas desde las pollitas de 1 día de vida, a las gallinas en fase adulta.

Respecto a la disminución de resistencias a cefalosporinas de tercera generación desde las aves de 1 día de vida hasta las gallinas adultas, podría deberse a la ausencia de presión selectiva como consecuencia de un escaso uso de antibióticos. De hecho, otros autores (Baron *et al.*, 2014) observaron también que la prevalencia de resistencias a esta clase de antibióticos

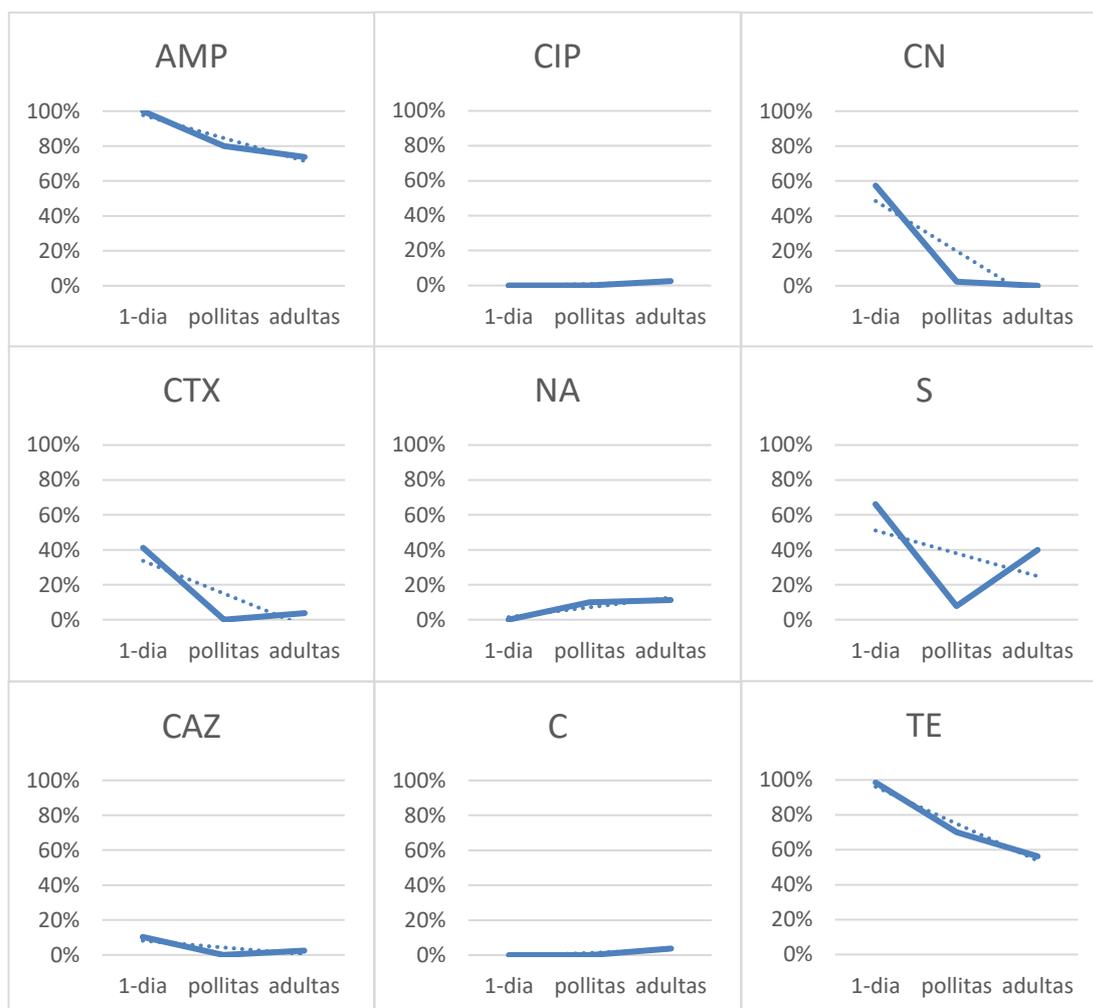


Figura 5. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas de heces por edad de las gallinas. La línea de puntos discontinua es la línea de tendencia.

era mayor en las gallinas durante la primera semana de vida. (Chauvin *et al.*, 2013) en un estudio realizado en Francia con gallinas ponedoras de diferentes granjas, comprobaron una reducción en la prevalencia de resistencias en las gallinas a medida que se incrementaba la edad de estas, sugiriendo que la elevada prevalencia durante los primeros días de vida se puede deber a un uso *off-label* de ceftiofur en pollitas de 1 día de vida. Por lo tanto, al desaparecer este estímulo, estas resistencias tienden a desaparecer de la población de *E. coli* de las gallinas.

**Respecto a las cepas aisladas del ambiente de la granja mediante el uso de calzas**, tal y como se ve en la Tabla 8, los antibióticos para los que se han presentado los mayores porcentajes de resistencias respecto al total de las cepas son AMP (60%) y TE (31,03%). Además, a diferencia

de lo observado en las heces, la presencia de cepas con resistencia a NA fue importante, con una prevalencia del 24,83%. Para el resto de los antibióticos el nivel de resistencias fue bajo, exceptuando S, para la que se observó un nivel moderado de resistencias (11,72%). En cuanto a las cefalosporinas, se observó un mayor porcentaje de resistencias a CTX, con un 6,21%, mientras que para CAZ fue inferior al 2%.



Figura 6. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas de calzas por edad de las gallinas.

Como pueden verse tanto en la Tabla 8 como en la Figura 6, los niveles se mantienen estables a lo largo del tiempo, excepto en el caso de AMP, S, TE y NA, donde se aprecia una clara tendencia al incremento de las resistencias, y el caso de la CN, donde disminuye claramente. Esto sugiere que las cepas con resistencia a AMP se pueden mantener y extender fácilmente entre las poblaciones de *E. coli* del ambiente de la granja. Teniendo en cuenta el escaso uso de antibióticos en las aves estudiadas, esto parece indicar que los mecanismos de resistencia a AMP (y posiblemente otros  $\beta$ -lactámicos) predominantes entre las cepas aisladas en el estudio no suponen un descenso del *fitness* (definida como la capacidad de un genotipo o individuo de sobrevivir y reproducirse (Andersson & Hughes, 2010)) de estas cepas. Además, como indican Andersson & Hughes (2010), entre las bacterias resistentes se pueden dar casos de evolución

compensatoria, que puede estabilizar la presencia de bacterias resistentes en ausencia de antibióticos, haciendo que estas bacterias tengan una *fitness* similar al de los clones sensibles.

Respecto a CTX y CAZ, no se observa un incremento en la cantidad de resistencias a medida que se avanza en el tiempo, aunque sí se observa cómo estas resistencias permanecen en el ambiente, lo que podría favorecer su incremento en caso de que se aplicaran tratamientos antibióticos que las favorecieran de forma directa o indirecta (por co-selección a partir del tratamiento con otras clases de antibióticos), contribuyendo a la expansión de estas resistencias entre las poblaciones de las aves, incluso hasta alcanzar al personal de la explotación ganadera.

En nuestro estudio, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación ha sido esporádica en las cepas aisladas de calzas, lo que sugiere que, aunque pueden permanecer en el ambiente, no se encuentran entre las poblaciones de *E. coli* predominantes. Sin embargo, en otros estudios (Baron *et al.*, 2014; Mo *et al.*, 2016), mediante métodos selectivos se han aislado cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas a partir de muestras ambientales de las granjas. Esto demuestra que estas cepas son capaces de permanecer en el ambiente. Mo *et al.* (2016) a partir de muestras de calzas de varias granjas de pollos de engorde en Noruega y usando métodos selectivos para el aislamiento de cepas resistentes a cefalosporinas, identificaron como los factores de riesgo más importantes para la ocurrencia de *E. coli* resistentes a cefalosporinas que la manada anterior de aves fuera positiva, además de no desinfectar el suelo entre los diferentes ciclos de producción, por lo que sugieren que la correcta limpieza y desinfección de las instalaciones son esenciales para disminuir el riesgo de contaminación cruzada entre la manada saliente y la entrante.

**Cuando se compara la prevalencia de las diferentes resistencias a antibióticos en cepas aisladas de heces y de calzas** (Figura 7) se observa que en la mayoría de los casos los valores son similares y siguen el mismo patrón. En el caso, tanto de AMP como de TE, mientras que entre las cepas aisladas de heces la prevalencia de resistencias se reduce con el paso de pollitas a adultas, en las muestras ambientales del lecho donde se encuentran las aves, se aprecia un incremento de las resistencias. De hecho, para estos antibióticos la prevalencia de resistencias tiende a igualarse entre las heces y el ambiente. Estos resultados son esperados, ya que las cepas que se encuentran en el ambiente provienen en su mayoría de la propia microbiota de las gallinas, por lo que lo que es esperable que se dé una relación entre las resistencias observadas.

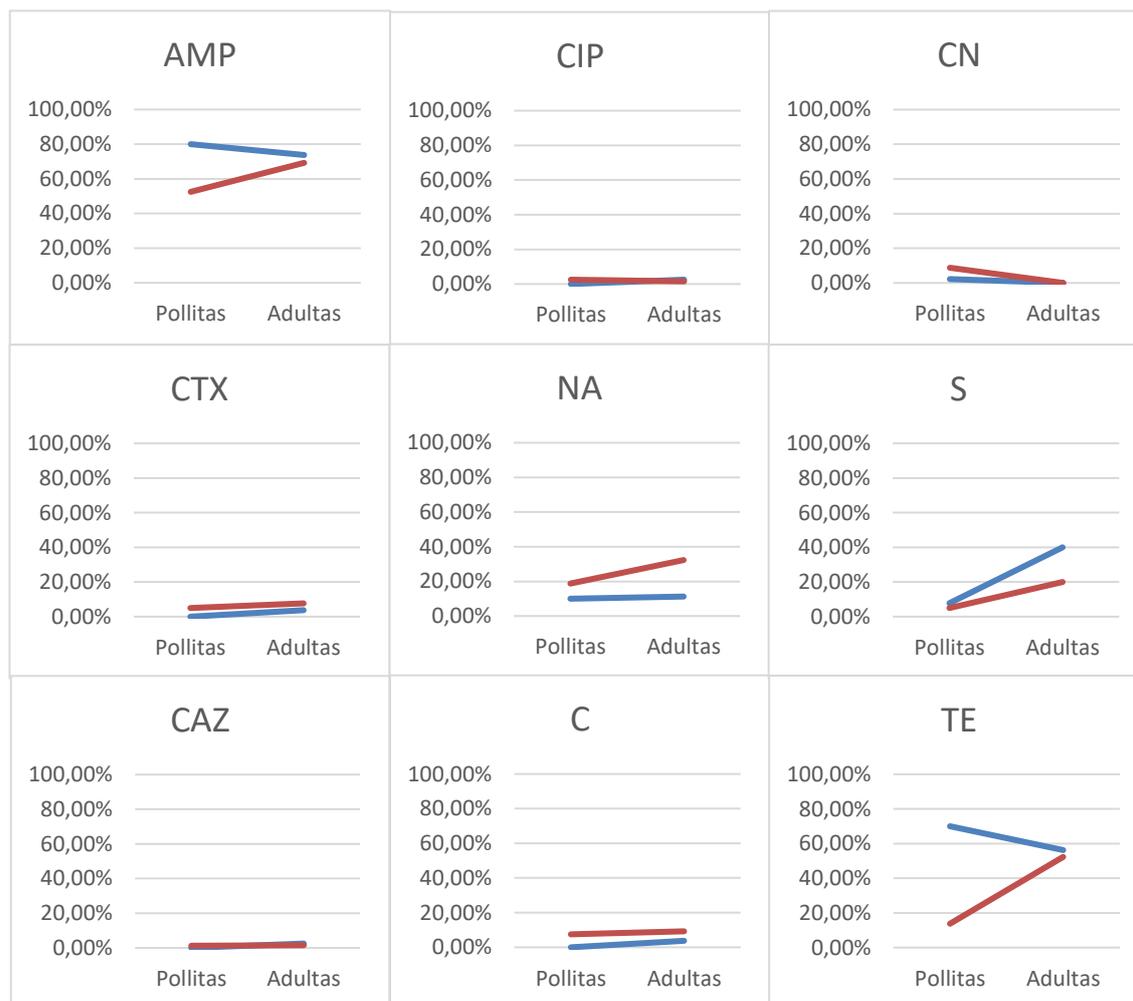


Figura 7. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos en las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (naranja) por edad de las gallinas.

### 5.1.2.2. Frecuencia de resistencias por cepa

La Tabla 9 resume los resultados obtenidos:

**En el caso de los meconios** todas las cepas presentaban entre 2 y 6 resistencias a antibióticos, siendo las más frecuentes las resistentes a 4 antibióticos (45,58%).

**En el caso de las cepas aisladas de las heces**, no se observaron más de 5 resistencias y las cepas con 4 o 5 resistencias fueron esporádicas. Entre las aisladas de heces de pollitas, las cepas mostraron con mayor frecuencia 2 (43,33%) y 1 resistencias (36,67%), mientras que, en las cepas procedentes de heces de gallinas adultas, lo más frecuente fue encontrar 2 (35%) o 3 resistencias (32,5%).

Por su parte, **en las cepas aisladas de las calzas**, las cepas aisladas durante la fase de pollitas mostraron con mayor frecuencia 1 resistencia (41,25%) o ninguna (32,5%). Entre las cepas aisladas del ambiente cuando las gallinas estaban en fase adulta, se observaron principalmente cepas con 3 (36,92%) o 2 resistencias (27,69%).

Origen	Edad	Número de resistencias						
		0R	1R	2R	3R	4R	5R	6R
Meconios	1 día (N=68)	0% (n=0)	0% (n=0)	19,12% (n=13)	13,23% (n=9)	45,58% (n=31)	19,12% (n=13)	2,94% (n=2)
Heces	Pollitas (N=90)	4,44% (n=4)	36,67% (n=33)	43,33% (n=39)	15,56% (n=14)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)
	Adultas (N=80)	18,75% (n=15)	10% (n=8)	35% (n=28)	32,5% (n=26)	2,5% (n=2)	1,25% (n=1)	0% (n=0)
	Total (N=170)	11,18% (n=19)	24,12% (n=41)	39,41% (n=67)	23,53% (n=40)	1,18% (n=2)	0,59% (n=1)	0% (n=0)
Calzas	Pollitas (N=80)	32,5% (n=26)	41,25% (n=33)	12,5% (n=10)	7,5% (n=6)	5% (n=4)	1,25% (n=1)	0% (n=0)
	Adultas (N=65)	20% (n=13)	12,31% (n=8)	27,69% (n=18)	36,92% (n=24)	3,08% (n=2)	0% (n=0)	0% (n=0)
	Total (N=145)	26,9% (n=39)	28,28% (n=41)	19,31% (n=28)	20,69% (n=30)	4,14% (n=6)	0,69% (n=1)	0% (n=0)

Tabla 9 Distribución del número de resistencias albergadas por cepa en cepas aisladas de *E. coli* aisladas de meconios, heces y calzas. N (total de cepas para el origen); n (total de cepas en el muestreo).

El porcentaje de cepas sensibles a todos los antibióticos testados varió en función del origen y del momento del ciclo de cría de las aves: En las cepas aisladas de heces, solo un 4,44% de las cepas aisladas de pollitas fueron sensibles a todos los antibióticos, mientras que en las aisladas de gallinas adultas el porcentaje fue del 18,75%. Por su parte, de las cepas aisladas de calzas, el porcentaje de cepas sensibles a todos los antibióticos en la fase de pollitas fue del 32,5% mientras que en la fase de adultas descendió al 20%.

**En cuanto a la relación entre el número de resistencias por cepa y el grupo de edad de las gallinas**, se han encontrado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las cepas aisladas de aves de 1 día y las aisladas tanto de heces de pollitas como de adultas; entre las cepas aisladas de calzas en la fase de pollitas y las aisladas en la fase de adultas; y por último también se encontraron diferencias significativas entre las cepas aisladas de heces y las aisladas de calzas en la fase de pollitas.

La mayor carga de resistencias a antibióticos entre la población de *E. coli* observada en las cepas aisladas de meconios respecto a lo observado en las cepas aisladas de las heces, refuerzan la idea del posible uso de antibióticos en las gallinas en los primeros días de vida. Posteriormente, la ausencia de una presión selectiva constante haría que las poblaciones con mayor carga de resistencias fuesen sustituidas por otras con una menor cantidad de resistencias, pero con una mayor *fitness* en esas condiciones.

A partir de los datos obtenidos de las cepas de *E. coli* aisladas de las calzas, se aprecia como la cantidad de cepas que albergan solo 1 resistencia disminuye en el tiempo mientras que la cantidad de cepas con 2 resistencias (principalmente) y 3 resistencias aumenta. Esto puede ser debido a que la probabilidad de que se den transferencias horizontales de genes entre las diferentes poblaciones se incrementa con el tiempo.

Al comparar los datos de las cepas aisladas tanto de heces como de calzas, se detecta en ambos casos una tendencia a presentar 2 o 3 resistencias. El incremento que se da en el número de resistencias de las cepas aisladas en ambos orígenes a medida que se avanza en el muestreo puede ser debido, como en el caso anterior, a que se dan transferencias entre las diferentes cepas resistentes.

En cambio, el porcentaje de cepas sin resistencias se mantiene o incrementa, debido probablemente a que no se han dado episodios prolongados o muy repetidos de tratamientos antibióticos a lo largo del tiempo del estudio, lo que ha favorecido a una importante presencia de cepas sensibles en heces, lo que se ha visto también reflejado en las cepas aisladas del ambiente (calzas).

### 5.1.2.3. Perfiles de resistencias

En cuanto al perfil de resistencias a antibióticos, **en el caso de los meconios** (Tabla 10) se observaron 12 diferentes, siendo el más frecuente “AMP-TE-CN-S” en el 30,88% de los casos, seguido del perfil “AMP-TE” (19,12%) y el perfil “AMP-TE-CN-CTX-S” (11,76%). Para el resto de los perfiles el porcentaje fue inferior al 10%.

Perfil	Porcentaje (nº cepas)
AMP-CTX-S	1,47% (1)
AMP-TE-CN	2,94% (2)
AMP-TE-CN-CTX-CAZ	2,94% (2)
AMP-TE-CN-CTX-CAZ-S	2,94% (2)
AMP-TE-CTX	2,94% (2)
AMP-TE-CTX-CAZ-S	4,41% (3)
AMP-TE-CN-CTX	5,88% (4)
AMP-TE-S	5,88% (4)
AMP-TE-CTX-S	8,82% (6)
AMP-TE-CN-CTX-S	11,76% (8)
AMP-TE	19,12% (13)
AMP-TE-CN-S	30,88% (21)

Tabla 10 Perfiles de resistencias observados en las cepas de *E. coli* aisladas de meconios. N=68

**En las cepas aisladas de heces** (Tabla 11) se observaron hasta 17 perfiles de resistencia distintos. En función del momento del ciclo de las gallinas, la frecuencia de los perfiles fue diferente. Así, en el caso de las cepas aisladas de pollitas los principales perfiles fueron “AMP-TE” (38,89%), “AMP” (22,22%) y “TE” (14,44%). En el caso de las cepas aisladas de las gallinas adultas, los principales perfiles fueron “AMP-TE-S” (28,78%) y “AMP-TE” (16,25%).

Por su parte, **en las cepas aisladas de las calzas** (Tabla 11) se observaron hasta 22 perfiles de resistencia distintos. En aquellas muestras que se corresponden al periodo de las gallinas en fase de pollitas los principales perfiles fueron “AMP” (27,5%) y “NA” (11,25%), mientras que en

las cepas aisladas cuando las gallinas estaban en fase adulta, los perfiles más frecuentes fueron “NA-AMP-TE” (15,38%), “NA-AMP” (13,85%), “AMP-TE-S” (12,31%).

	Heces			Calzas		
	Pollitas (90)	Adultas (80)	Total (170)	Pollitas (80)	Adultas (65)	Total (145)
-	4,44% (4)	18,75% (15)	11,18% (19)	32,5% (26)	20% (13)	26,9% (39)
AMP	22,22% (20)	5% (4)	14,12% (24)	27,5% (22)	9,23% (6)	19,31% (28)
TE	14,44% (13)	3,75% (3)	9,41% (16)	1,25% (1)	3,08% (2)	2,07% (3)
NA	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	11,25% (9)	0% (0)	6,21% (9)
S	-	-	-	1,25% (1)	0% (0)	0,69% (1)
AMP-C	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	0% (0)	1,54% (1)	0,69% (1)
AMP-S	0% (0)	10% (8)	4,71% (8)	1,25% (1)	0% (0)	0,69% (1)
AMP-CN	2,22% (2)	0% (0)	1,18% (2)	-	-	-
AMP-TE	38,89% (35)	16,25% (13)	28,24% (48)	6,25% (5)	9,23% (6)	7,59% (11)
NA-AMP	1,11% (1)	5% (4)	2,94% (5)	3,75% (3)	13,85% (9)	8,28% (12)
NA-TE	1,11% (1)	1,25% (1)	1,18% (2)	-	-	-
TE-S	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	0% (0)	1,54% (1)	0,69% (1)
TE-CN	-	-	-	1,25% (1)	0% (0)	0,69% (1)
AMP-CTX	-	-	-	0% (0)	1,54% (1)	0,69% (1)
AMP-TE-S	7,78% (7)	28,75% (23)	17,65% (30)	1,25% (1)	12,31% (8)	6,21% (9)
AMP-CTX-CAZ	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	1,25% (1)	1,54% (1)	1,38% (2)
NA-AMP-CIP	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	1,25% (1)	0% (0)	0,69% (1)
NA-AMP-TE	7,78% (7)	1,25% (1)	4,71% (8)	1,25% (1)	15,38% (10)	7,59% (11)
AMP-C-CN	-	-	-	2,5% (2)	0% (0)	1,38% (2)
AMP-CTX-TE	-	-	-	0% (0)	1,54% (1)	0,69% (1)
C-TE-S	-	-	-	0% (0)	6,15% (4)	2,76% (4)
AMP-C-TE-CTX	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	0% (0)	1,54% (1)	0,69% (1)
AMP-C-CN-CTX	-	-	-	3,75% (3)	0% (0)	2,07% (3)
NA-AMP-CIP-TE	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	1,25% (1)	1,54% (1)	1,38% (2)
AMP-C-TE-CTX-CAZ	0% (0)	1,25% (1)	0,59% (1)	-	-	-
AMP-C-TE-CN-S	-	-	-	1,25% (1)	0% (0)	0,69% (1)

Tabla 11. Perfiles de resistencias observados en las cepas de *E. coli* aisladas de heces y calzas.

Estos datos muestran como las resistencias a AMP y la TE están ampliamente extendidos entre las diferentes poblaciones de *E. coli* que conforman el microbioma de las gallinas reproductoras y son a su vez un riesgo, ya que pueden propiciar la co-selección de resistencias a otros antibióticos, aunque no se usen o se usen de forma menos frecuente (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011). Además, puesto que en la mayoría de los casos se encuentran en elementos genéticos móviles, mayoritariamente plásmidos, su expansión entre las poblaciones bacterianas de las explotaciones se produce con mucha facilidad (Beceiro *et al.*, 2012).

Siguiendo en la misma línea, en el caso de las cepas provenientes de calzas, se observó un descenso en el tiempo del número de cepas que solo eran resistentes a “AMP” o “NA”, aumentando el número de perfiles en los que la resistencia a estos antibióticos aparecía en

combinación con otros. Teniendo en cuenta también que las resistencias a AMP y NA eran de las más frecuentes en los primeros muestreos, no sería de extrañar que por transferencia genética horizontal se combinen las resistencias a antibióticos más frecuentes, tanto entre ellas como con otras.

#### 5.1.2.4. Multirresistencias

Al igual que en los casos anteriores, se ha considerado como multirresistentes (MR) a aquellas cepas resistentes a 3 o más antibióticos de diferente clase (Magiorakos *et al.*, 2012). **En meconios** se observaron un 76,47% de cepas MR (52 cepas de un total de 68). **De las cepas aisladas de heces**, fueron MR un 24,12% de las cepas (41 cepas de un total de 170). Finalmente, **en el caso de las cepas provenientes de calzas** el porcentaje de cepas MR observado fue del 22,76% (33 cepas de un total de 145).

En las heces, el porcentaje de cepas MR en las pollitas fue del 15,56% (14 cepas de 90) mientras que en gallinas adultas fue del 33,75% (27 cepas de 80). Respecto a las cepas aisladas de calzas, en el periodo de pollitas la prevalencia de MR fue del 11,25% (9 cepas de 80), mientras que cuando las gallinas estaban en la etapa adulta, la prevalencia fue del 36,92% (24 cepas de 65). Solo se observaron diferencias significativas (P-valor <0,05) entre los meconios y las cepas aisladas de las heces de las pollitas.

Tanto en heces como en calzas se ha observado el mismo patrón en el incremento de cepas MR en el tiempo, con valores similares para ambos orígenes, tanto en pollitas como en adultas (Figura 8). Baron *et al.* (2014) también observaron valores de MR similares, del 46,2%, en aislados de *E. coli* procedentes tanto de pollos de engorde (desde el día 1 de vida hasta el 77) como de gallinas ponedoras (desde el día 1 de vida hasta el 200), aunque tan solo se analizaron cepas resistentes a cefalosporinas.

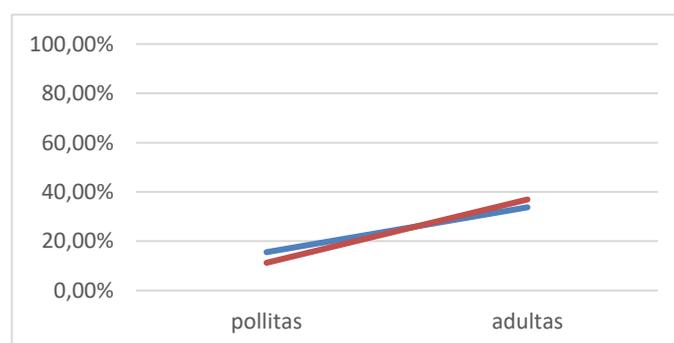


Figura 8. Prevalencia de multirresistencias (MR) en cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (naranja).

#### 5.1.2.5. Prevalencia y perfiles de genes de resistencias a antibióticos

En la Tabla 12 se puede ver la prevalencia y frecuencia de cada uno de los genes de resistencia antibiótica buscados. **En las cepas aisladas de meconios** el único gen que se detectó fue *CMY-2*, en el 100% de las cepas (68 cepas). Baron *et al.* (2014), en un estudio realizado tanto con gallinas ponedoras como con pollos de engorde, observaron también una presencia elevada

del gen *CMY-2* en cepas aisladas de gallinas durante los primeros días de vida, aunque, a diferencia de nuestro estudio, éstas también presentaron otros genes de resistencia, como el *SHV*.

origen (N)	Prevalencia genes				
	<i>CMY-2</i> (n)	<i>SHV</i> (n)	<i>TEM</i> (n)	<i>qnrB</i> (n)	<i>qnrS</i> (n)
Meconios (68)	100% (68)	0,00% (0)	0,00% (0)	0,00% (0)	0,00% (0)
Heces (41)	2,44% (1)	87,8% (36)	90,24% (37)	87,8% (36)	24,39% (10)
Calzas (23)	21,74% (5)	43,48% (10)	47,83% (11)	34,78% (8)	39,13% (9)

Tabla 12. Prevalencia de los genes de resistencia testados mediante PCR. N = número total de cepas; n = número de cepas

**En las cepas provenientes de las heces** se detectó la presencia de las 5 familias de genes testados en el estudio. Los más prevalentes fueron *TEM*, presente en el 90,24% de las cepas, seguido de los genes *SHV* y *qnrB*, en el 87,8%. Los genes restantes se observaron en porcentajes muy inferiores, especialmente en el caso del gen *CMY-2*, que se detectó de forma muy esporádica, a pesar de haberse detectado en todas las cepas aisladas de meconios.

**En el caso de las cepas aisladas de las calzas**, un 8,7% de las cepas fueron negativas para todos los genes testados. En aquellas que resultaron positivas, las prevalencias observadas no superaron el 50% en ninguno de los genes, aunque, a diferencia de lo observado en las heces, fueron superiores al 20% para todos los genes. Al igual que en las heces, el más prevalente fue *TEM*, con un 47,83%, seguido de *SHV* (43,48%). Los genes de resistencia a quinolonas *qnrS* y *qnrB* mostraron prevalencias similares (39,13% y 34,78% respectivamente), mientras que en heces la prevalencia del gen *qnrB* fue muy superior a la del *qnrS*. Para el gen *CMY-2* se obtuvo un porcentaje de prevalencia del 21,74%.

Tanto en las heces como en las calzas las prevalencias de los genes ESBL (*TEM* y *SHV*) y el gen PMQR *qnrB* eran similares, sugiriendo su posible coexistencia dentro del mismo plásmido (ya que tanto el gen *qnrB* como el *qnrS* están asociados a plásmidos). De hecho, en diferentes investigaciones (Paterson *et al.*, 2000; Lautenbach *et al.*, 2001) se ha observado la asociación de resistencia a cefalosporinas y quinolonas. De acuerdo con (Robicsek *et al.*, 2006), un mecanismo por el que esto es posible es la incorporación en el mismo plásmido de genes *qnr* y genes de ESBL o  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC.

Al comparar los resultados obtenidos en los diferentes orígenes, se aprecia una gran homogeneidad en las cepas provenientes de los meconios, ya que todas las cepas fueron positivas para el mismo gen y no se detectaron ninguno de los otros 4.

La mayor prevalencia del gen *CMY-2* en las muestras de las gallinas de 1 día de vida (meconios) respecto a la observada en las cepas de *E. coli* aisladas de heces y de calzas, sugiere que, aunque presente en la microbiota, en las condiciones en las que se criaron las gallinas y usándose antibióticos solo de forma esporádica, este gen no prolifera en el tiempo y su prevalencia disminuye. Dame-Korevaar *et al.* (2017) en un estudio con gallinas parentales, también apreciaron un descenso en la prevalencia del gen *CMY-2* a medida que se incrementaba la edad de las gallinas, pasando del 91% en las muestras fecales obtenidas en la primera semana a una prevalencia del 1% al final de su estudio. Los autores sugirieron que la elevada prevalencia observada en la primera semana se puede deber a la transmisión vertical

desde el “grandparent Flock” u otras fuentes de contaminación, como la incubadora o el transporte, lo que podría haber ocurrido también en nuestro estudio. Además, estos autores estudiaron la presencia del plásmido IncA/C y sugirieron una posible falta de éxito de la combinación del gen CMY-2 con dicho plásmido.

Respecto al resto de muestras, indistintamente del origen, el gen más observado fue *TEM*, seguido de *SHV*. En un estudio realizado en los Países Bajos (Ceccarelli *et al.*, 2019) en el que se monitorizó la prevalencia de *E. coli* resistente a cefalosporinas de amplio espectro, los genes *CMY-2* y *SHV* se encontraron entre los 3 más observados. Manageiro *et al.* (2017) detectaron el gen *SHV* en 7 de 15 cepas de *E. coli* no sensibles a cefotaxima y/o cefoxitina, lo que supone aproximadamente un 46% de las cepas. Este porcentaje está en concordancia con la prevalencia que nosotros observamos en las calzas, pero muy por debajo de lo observado en las muestras de heces, donde el porcentaje fue superior al 90%.

En un estudio realizado en Portugal por Jones-Dias *et al.* (2013) con muestras aisladas de animales destinados a consumo humano, el porcentaje de genes PMQR fue bajo, inferior al 3% tanto para los genes *qnrB* como *qnrS* en cepas de *E. coli* y *Salmonella* aisladas de gallinas y cerdos, a diferencia de lo observado en nuestro estudio, en el que la prevalencia de estos genes fue importante. Por otra parte, en un estudio longitudinal realizado en Suecia (Börjesson *et al.*, 2016), no se observó la presencia de genes PMQR en los aislados resistentes a NA, sino que la resistencia era resultado de mutaciones en el *gyrA*, a diferencia de lo observado en nuestro estudio, donde la prevalencia de genes PMQR fue frecuente

La presencia de estos genes de resistencia en las instalaciones es un riesgo, no solo para su transmisión entre animales, sino también para su difusión al medio ambiente. Diversos investigadores han mostrado que es posible que se dé una transferencia de cepas de bacterias ESBL/AmpC desde las granjas de pollos de engorde hacia las áreas de su entorno (Laube *et al.*, 2014). Dame-Korevaar *et al.* (2017) observaron resistencias en casi todas las muestras ambientales que analizaron. Además, observaron que antes de la ubicación de las gallinas en la zona de puesta esta zona era negativa para cepas resistentes a cefalosporinas, y concluyeron que muy probablemente las gallinas introdujeron las cepas ESBL/pAmpC en la zona de puesta. Además, hay estudios que confirman la supervivencia de *E. coli* en suelos hasta 7 meses después de su fertilización con heces de pollos de engorde (Merchant *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos, tanto en el presente estudio como por otros autores, muestran que las cepas de *E. coli* ESBL/AmpC perduran en el ambiente de las instalaciones, que puede actuar así de reservorio.

La presencia de genes de resistencia en el ambiente es un problema, debido a que actuaría como reservorio y fuente de contaminación con cepas positivas para diferentes genes de resistencia, tanto ESBL como PMQR. Su presencia en ambientes con una elevada probabilidad de entrar en contacto con patógenos humanos son los que suponen un mayor riesgo (Martínez *et al.*, 2015).

Respecto al número de genes observados por cada cepa (Tabla 12), como ya se ha comentado, en los meconios solo se observó el gen *CMY-2*. Sin embargo, tanto en heces como en calzas se observaron cepas que albergaron varios genes (Figura 9). Las cepas aisladas de heces eran portadoras de entre 2 y 4 genes, teniendo la mayoría 3 genes de resistencia (82,93%). No se detectaron cepas con 5 genes o 1 solo gen, ni negativas para los 5 genes testados. En el caso de las calzas se observaron, desde cepas sin genes de resistencia hasta cepas que portan los 5 genes testados. La mayoría de las cepas fueron positivas para 1 (43,48%) y 3 genes (26,09%).

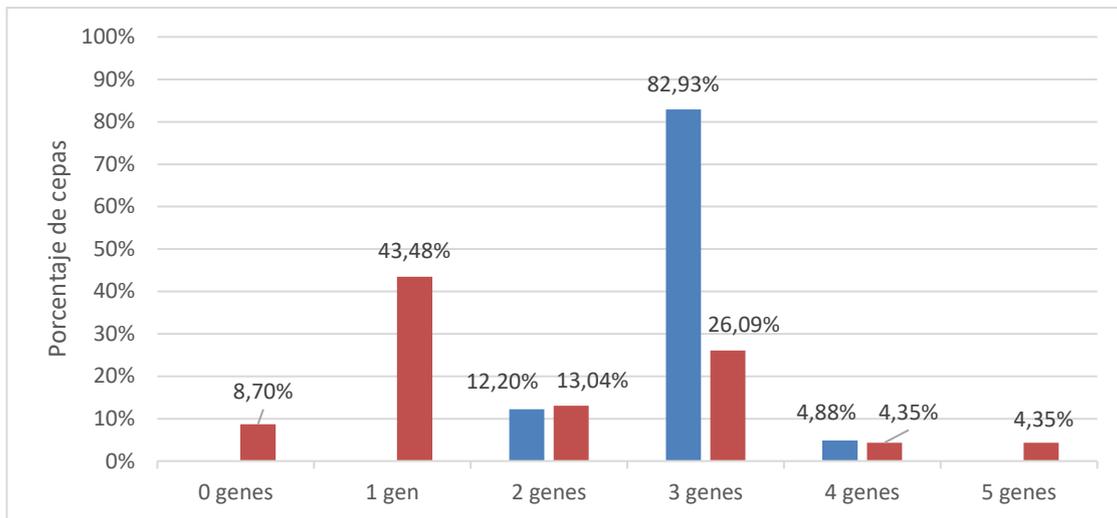


Figura 9. Número de genes albergados por las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (rojo).

Por último, respecto a los perfiles genéticos observados (Tabla 13), en las cepas aisladas de meconios tan solo se observó el perfil “*CMY-2*” en todas ellas. En el caso de las cepas aisladas de heces se observaron un total de 10 perfiles diferentes. El perfil que más destaca es “*SHV-TEM-qnrB*”, con porcentaje del 70,73%. El resto de los perfiles se observaron en un porcentaje muy inferior, menos del 50% en todos los casos. Por último, entre las cepas aisladas de calzas se observaron 9 perfiles distintos. De estos, el más observado fue “*SHV-TEM-qnrB*” con un porcentaje del 26,09%, seguido de los perfiles “*CMY-2*” y “*qnrS*”, con un porcentaje en ambos del 17,39%. El resto de los perfiles se observaron en menos del 10% de las cepas.

Origen (N)	Perfil	Prevalencia (n)
Meconios (68)	CMY	100% (68)
	<i>SHV-TEM-qnrB</i>	70,73% (29)
	<i>SHV-TEM-qnrB-qnrS</i>	4,88% (2)
	<i>TEM-qnrB-qnrS</i>	4,88% (2)
Heces (41)	<i>TEM-qnrS</i>	4,88% (2)
	<i>SHV-CMY-qnrS</i>	2,44% (1)
	<i>SHV-TEM-qnrS</i>	2,44% (1)
	<i>SHV-qnrB</i>	2,44% (1)
	<i>SHV-qnrB-qnrS</i>	2,44% (1)
	<i>SHV-qnrS</i>	2,44% (1)
	<i>TEM-qnrB</i>	2,44% (1)
	-	8,7% (2)
Calzas (23)	<i>SHV-TEM-qnrB</i>	26,09% (6)
	CMY	17,39% (4)
	<i>qnrS</i>	17,39% (4)
	<i>SHV-qnrS</i>	8,7% (2)
	TEM	8,7% (2)
	<i>SHV-TEM-CMY-qnrB-qnrS</i>	4,35% (1)
	<i>SHV-TEM-qnrB-qnrS</i>	4,35% (1)
	<i>TEM-qnrS</i>	4,35% (1)

Tabla 13. Prevalencia de los perfiles de genes de resistencia antibiótica observados en las cepas de *E. coli* aisladas de meconios, heces y calzas. N = número total de cepas; n = número de cepas

Aunque en las heces se observaron más perfiles de genes que en las calzas, la mayoría de las cepas presentaban el mismo perfil ("*SHV-TEM-qnrB*"), relegando al resto a casos esporádicos. En las calzas no hubo un perfil tan dominante respecto al resto. Esto parece sugerir que hay mayor diversidad en las poblaciones de *E. coli* ambientales (calzas) que en las que habitan la microbiota de las gallinas (heces).

La asociación entre genes ESBL/AmpC y PMQR observada en este trabajo se ha informado previamente en diferentes estudios (Paterson *et al.*, 2000; Lautenbach *et al.*, 2001; Robicsek *et al.*, 2006). En nuestro estudio, casi todas las cepas resistentes a cefalosporinas y/o CIP han presentado alguno de los 3 genes ESBL y alguno de los 2 genes PMQR testados mediante PCR. Esto es más claro en el caso de las heces, donde todas las cepas han sido positivas, tanto para genes ESBL como PMQR.

## 5.2. Prevalencia de resistencias a antibióticos y de algunos de los principales genes de resistencia a cefalosporinas y quinolonas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de una granja de gallinas reproductoras durante la fase de producción

### 5.2.1. Materiales y métodos

El diseño del plan de muestreo se basó en el “Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*” (SANCO, 2016).

Las muestras se tomaron de una granja de gallinas reproductoras adultas ubicada en la zona Este de España. La granja contenía un total de 14688 gallinas y 5125 pollos. La nave muestreada estaba compuesta 4100 gallinas y 408 pollos. La edad inicial de las gallinas fue de 27 semanas y la final de 54 semanas. Las muestras consistieron en: un par de calzas absorbentes impregnadas con el lecho de la nave muestreada y dos muestras compuestas de heces de 250g que posteriormente se homogenizaron en una única muestra de 25g. Las muestras se tomaron en base a las indicaciones del “Programa Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*” (SANCO, 2016) con el fin de asegurar que las muestras fuesen representativas de toda la manada de gallinas.

A las aves se les administró, por parte de veterinarios autorizados, 1 tratamiento con enrofloxacino (fluoroquinolona) por motivos sanitarios durante 5 días en la semana del 22 al 26 de agosto de 2016, momento que se correspondería con el muestreo 4.

La metodología aplicada para la preparación inicial de las muestras, aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli*, realización de los antibiogramas y análisis estadístico fue la misma que la descrita en el apartado 5.1.

Se realizaron las mismas PCR y con las mismas condiciones que en el capítulo anterior. Sin embargo, además de analizar todas las cepas multirresistentes, en este caso se incluyeron aquellas cepas que presentaron resistencia o sensibilidad intermedia a CIP, CAZ y/o CTX.

### 5.2.2. Resultados y discusión

#### 5.2.2.1. Prevalencia de resistencias a antibióticos

Se aislaron un total de 576 cepas de *E. coli*, 320 procedentes de muestras de heces de las gallinas reproductoras y 256 cepas de las calzas.

En la Tabla 14 se indican las frecuencias de resistencia para cada uno de los antibióticos testados, así como los antibióticos para los que se observaron diferencias significativas ( $p$ -valor  $<0,05$ ) entre los resultados obtenidos en función del origen.

Dos cepas aisladas de heces y 1 cepa aislada de calzas mostraron resistencia a alguna cefalosporina de 3ª generación, por lo que se les comprobó el fenotipo ESBL. Las 3 cepas testadas fueron positivas para este fenotipo, mostrando un incremento de  $\geq 5$  mm a la combinación de CTX y CAZ con ácido clavulánico.

En función de la prevalencia de las resistencias observadas se clasificó el nivel de resistencia, basándose en los valores indicados en (EFSA & ECDC, 2018): esporádico  $< 0,1\%$ ; muy bajo  $0,1-1,0\%$ ; bajo  $> 1,0-10,0\%$ ; moderado  $> 10,0-20,0\%$ ; elevado  $> 20,0-50,0\%$ ; muy elevado  $50,0-70,0\%$ ; extremadamente elevado  $> 70,0\%$ .

	Antibióticos								
	AMP	CTX	CAZ	CIP	NA <sup>a</sup>	TE <sup>a</sup>	S	CN	C
<b>Heces</b> (N=320)	44,38% (142)	0,31% (1)	0,63% (2)	8,44% (27)	24,06% (77)	48,44% (155)	1,88% (6)	0,63% (2)	0,63% (2)
<b>Calzas</b> (N=256)	49,61% (127)	0,39% (1)	0% (0)	5,47% (14)	39,84% (102)	27,73% (71)	1,56% (4)	0,78% (2)	0,39% (1)

Tabla 14. Prevalencia de resistencias en cepas de *E. coli* para los distintos orígenes. N= número total de cepas en cada origen. Entre paréntesis está el número de cepas resistentes por antibiótico. <sup>a</sup> diferencia significativa entre heces y calzas.

**En las cepas aisladas de heces**, los mayores niveles de resistencia se encontraron para TE, AMP y NA (48,44%, 44,38% y 24,06% respectivamente) con un nivel elevado de resistencias. Para el resto de los antibióticos, el nivel fue bajo (CIP y S) o muy bajo (C, CN, CAZ y CTX). Por su parte, **en las calzas**, los niveles de resistencia observados fueron similares a los observados en heces: se observaron niveles elevados de resistencia para AMP, NA y TE (49,61%, 39,84% y 27,73% respectivamente). Para el resto de los antibióticos, se observaron niveles bajos para CIP y S y niveles muy bajos para CTX, C y CN. No se observó ninguna cepa resistente a CAZ en las cepas aisladas de calzas.

Los resultados obtenidos no muestran una elevada frecuencia de resistencias para el conjunto de los antibióticos testados, independientemente del origen de las cepas. Las resistencias observadas se concentran en AMP, TE y NA, tanto en cepas aisladas de heces como de calzas. La prevalencia observada entre los distintos orígenes es muy similar, observándose diferencias significativas tan solo en el caso de NA y TE, con frecuencias muy superiores en las cepas aisladas de calzas para NA con respecto a las aisladas de heces, y a la inversa en el caso de TE.

Teniendo en cuenta la baja exposición a antibióticos (tan solo se aplicó un tratamiento con enrofloxacino), nuestros resultados parecen confirmar que, en ausencia de presión selectiva, la presencia de resistencias a antibióticos es escasa. Revisiones sistemáticas y metaanálisis como el de (Tang *et al.*, 2017) han demostrado también que una reducción en el uso de antibióticos en animales de consumo reduce la cantidad de resistencias observadas en los aislados de esos animales.

Siguiendo las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2019) sobre antibióticos de importancia crítica, la baja prevalencia de resistencia a muchos antibióticos

considerados de importancia crítica, como son CN, S, CTX, CAZ y CIP, y de elevada importancia como el C, obtenidos en este estudio, suponen una buena noticia, ya que una baja carga de resistencias a estos antibióticos supone un menor riesgo de transmisión a las personas a través de la cadena alimentaria. No obstante, sí se han observado niveles elevados de resistencia para algunos antibióticos de importancia crítica (AMP y NA) y de importancia elevada (TE).

Al comparar los datos de prevalencia de resistencias con los datos aportados por el informe sobre resistencias en alimentos, humanos y animales de consumo elaborado por EFSA (EFSA & ECDC, 2018), los porcentajes de resistencias de nuestro estudio son en general inferiores a la media de la UE. La principal diferencia se observa en el caso de NA y CIP, donde la media europea se situó en 59,8% (NA) y 64% (CIP), mientras que en nuestro estudio la resistencia a NA más elevada fue la observada en calzas, 39,84%, mientras que en el caso del CIP fue inferior al 10% para ambos orígenes. La prevalencia de resistencia a CTX y CAZ fue baja en la media europea mientras que en nuestro caso fue muy baja, con porcentajes inferiores al 1%. En el caso de AMP, la prevalencia a nivel europeo (58%) fue también superior a la de nuestro estudio. EL único antibiótico para el que la prevalencia fue similar fue para TE: en nuestro caso la frecuencia de cepas resistentes (48,44%) aisladas de heces fue algo superior a la media (47,1%).

En cuanto a la comparación con los datos sobre España, la prevalencia observada en nuestro estudio fue muy inferior a los aportados por el estudio de EFSA, en cuyo informe destaca la elevada resistencia a CIP (91,2%), NA (88,3%), AMP (62,6%) y TE (61,4%). De hecho, sobre todo para los datos referentes a CIP, los datos que hemos obtenido están en niveles similares a los aportados por los países nórdicos (6,1% en Noruega; 5,7% en Suecia; 3,8% en Finlandia), países con baja prevalencia de resistencias a antibióticos en gallinas y pollos de engorde.

Respecto a otros estudios realizados en países europeos con muestras tomadas en granjas de gallinas, la prevalencia de resistencia a los diferentes antibióticos parece variar en función de la granja y del país. En general, la mayoría de las resistencias se encuentran para AMP, TE y NA. No obstante, en algunos casos se observaron niveles de resistencia a CIP preocupantes, con prevalencias que superaron el 50%. Así, Harisberger *et al.* (2011) en un estudio en el que tomaron muestras de granjas de gallinas ponedoras en Suiza, observaron resistencias predominantemente a AMP, TE y NA, aunque con porcentajes inferiores a los observados en nuestro estudio, mientras que en su trabajo las resistencias a CIP (16,7%) fueron bastante más elevadas. En un estudio realizado en España, Moreno *et al.* (2019) observaron, al igual que nosotros, bajos niveles de resistencia en cepas aisladas de gallinas ponedoras adultas, en especial para cefalosporinas de 3ª generación (no detectaron ninguna resistencia) y quinolonas. En su caso, las principales resistencias también fueron a AMP y TE, aunque la prevalencia fue inferior al 20% en ambos casos. Kaspersen *et al.* (2018), en un estudio para analizar la prevalencia de resistencia a quinolonas, informaron de un porcentaje de aislados resistentes a quinolonas del 3,6% en pollos de engorde y del 0,5% en gallinas ponedoras en cepas de *E. coli* aisladas entre 2009-2016 en el matadero en Noruega, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro estudio para CIP. Por otra parte, Hricová *et al.* (2017), en cepas aisladas del ambiente de granjas de gallinas, observaron una tasa de resistencia a CIP del 61% en cepas de *E. coli*, lo que se sitúa muy por encima, tanto de lo observado en nuestro estudio (en muestra de heces y de calzas) como en los estudios de otros

autores. Todas estas variaciones pueden deberse a los distintos sistemas de cría, así como los distintos tratamientos antibióticos previos y la propia variabilidad ambiental.

#### 5.2.2.2. Perfil de resistencias a antibióticos

En las cepas aisladas de **heces**, el número máximo de resistencias observadas por cepa fue de 4. No obstante, se observó sobre todo 1 resistencia antibiótica (44,06%) o ninguna (24,38%) (Figura 10). En un 17,81% de cepas se observaron 2 resistencias mientras que el porcentaje de cepas que presentaban 3 o 4 resistencias fue bajo (<10% en ambos). En el caso de las **calzas**, el número máximo de resistencias por cepa fue también 4. En este origen, un 34,38% de las cepas mostró 1 resistencia y un 30,08%, 2 resistencias. Un 26,97% fue sensible a todos los antibióticos testados y, al igual que en el caso de las heces, el porcentaje de cepas que presentaban 3 o 4 resistencias fue bajo (<6% en cada caso). Mediante el test de  $X^2$  se observaron diferencias significativas entre los orígenes para el número de resistencias por cepa ( $p$ -valor <0,05).

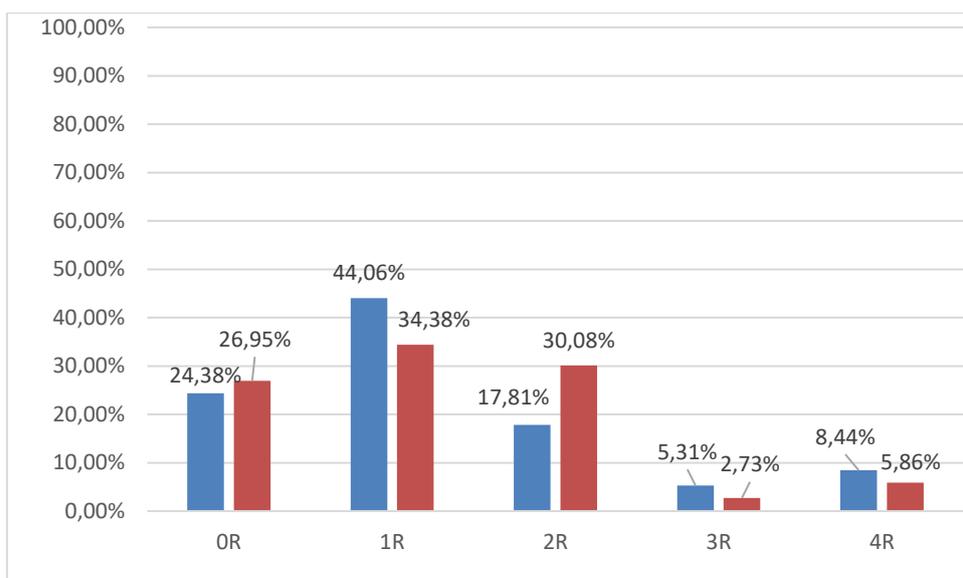


Figura 10. Prevalencia del número de resistencias a antibióticos observadas en las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (rojo).

La presencia de más de 2 resistencias por cepa no fue frecuente en ninguno de los dos orígenes (Figura 10). Esto sugiere que las cepas con menos de 3 resistencias a antibióticos son las que predominan en condiciones normales (en ausencia de presión antibiótica selectiva), posiblemente porque en estas condiciones las bacterias no tienen que dedicar recursos metabólicos a los mecanismos de resistencia a antibióticos, lo que les permitiría tener una mayor *fitness*, ya que la presencia de estos genes de resistencia, así como de elementos genéticos móviles, pueden suponer una carga metabólica importante, y por tanto una

desventaja ecológica, para las bacterias hospedadoras de dichos genes y/o elementos (Heuer *et al.*, 2011).

Además, por lo que se ha visto en el estudio, el ambiente parece ser un medio más propicio para la selección de resistencias que el tracto intestinal de las aves, al menos en condiciones de ausencia de tratamientos antibióticos. Esto podría deberse a que en el ambiente conviven poblaciones bacterianas provenientes del conjunto de la manada de las gallinas, así como aquellas que puedan ser introducidas por vectores como insectos (Blaak *et al.*, 2014) o los trabajadores de la instalación y personal de transporte que pueda acceder a las instalaciones (Mo *et al.*, 2016), dando lugar a una mayor probabilidad de transferencia genética horizontal entre cepas.

Respecto a los perfiles de resistencia observados (Tabla 15), en el caso de las **heces** se han obtenido 21 perfiles distintos. De ellos, los principales han sido “TE” (23,13%), “AMP” (16,56%) y “AMP-TE” (9,06%). La prevalencia del resto de los perfiles fue muy baja. Por su parte, en las cepas aisladas de las **calzas** se observaron 16 perfiles diferentes. Los principales fueron “NA-AMP” (25,39%), “TE” (16,02%) y “AMP” (13,28%). En el resto de los perfiles, al igual que sucede en el caso de las cepas aisladas de heces, el porcentaje de cepas es bajo.

A la vista de los datos de la Tabla 15, se aprecia una cantidad considerable de perfiles diferentes en ambos orígenes. No obstante, las cepas se agrupan principalmente en 2 o 3 perfiles, siendo los restantes muy minoritarios y, en muchos casos, tan solo presente en una cepa. Además, se observa que las resistencias a AMP y TE son las más extendidas y las que con mayor frecuencia se asocian a otras.

En base a los perfiles de resistencia obtenidos, se consideraron multirresistentes (MR) las cepas que presentaron resistencia a 3 o más antibióticos de distinta clase (Magiorakos *et al.*, 2012). En las cepas aisladas de heces, el porcentaje de cepas multirresistentes fue del 12,81% (41 cepas de un total de 320), mientras que en las cepas aisladas de calzas el porcentaje fue inferior, del 8,2% (21 cepas de un total de 256). Mediante el test de significación estadística  $X^2$  no se observaron diferencias significativas entre ambos orígenes ( $p$ -valor  $>0,05$ ).

	Perfil de resistencias	
	Heces	Calzas
AMP	16,56% (53)	13,28% (34)
NA	4,06% (13)	5,08% (13)
TE	23,13% (74)	16,02% (41)
S	0,31% (1)	-
AMP-CN	0,31% (1)	-
AMP-TE	9,06% (29)	2,34% (6)
C-TE	0,31% (1)	0,39% (1)
CIP-CAZ	0,31% (1)	-
NA-AMP	5,31% (17)	25,39% (65)
NA-TE	2,19% (7)	1,56% (4)
S-TE	0,31% (1)	-
TE-S	-	0,39% (1)
AMP-TE-CN	0,31% (1)	-
AMP-TE-S	0,63% (2)	0,39% (1)
NA-AMP-CIP	0,31% (1)	0,39% (1)
NA-AMP-TE	3,75% (12)	0,78% (2)
NA-CIP-TE	0,31% (1)	-
NA-AMP-CN	-	0,39% (1)
NA-AMP-S	-	0,78% (2)
AMP-TE-CTX-CAZ	0,31% (1)	-
AMP-TE-CN-CTX	-	0,39% (1)
NA-AMP-C-TE	0,31% (1)	-
NA-AMP-CIP-TE	7,19% (23)	5,08% (13)
NA-AMP-TE-S	0,31% (1)	0,39% (1)
NA-CIP-TE-S	0,31% (1)	-

Tabla 15. Prevalencia de los perfiles de resistencia a antibióticos observados en cada origen. Entre paréntesis se indica el número de cepas observadas para cada perfil. Número total de cepas en heces: 320. Número total de cepas en calzas: 256.

#### 5.2.2.3. Prevalencia y perfil de genes de resistencia a antibióticos

Las cepas multirresistentes y las resistentes o con sensibilidad intermedia a CTZ, CAZ y/o CIP fueron analizadas por PCR para la detección de algunos de los principales genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (incluyendo cefalosporinas) y de genes PMQR (Tabla 16).

	<b>CMY-2</b>	<b>SHV<sup>a</sup></b>	<b>TEM</b>	<b>qnrB<sup>a</sup></b>	<b>qnrS</b>
Heces (60)	23,33% (14)	10% (6)	80% (48)	56,67% (34)	90% (54)
Calzas (61)	26,23% (16)	32,79% (20)	88,52% (54)	83,61% (51)	93,44% (57)

Tabla 16. Prevalencia de los genes de resistencia a antibióticos testados por PCR. Entre paréntesis se indica el número de cepas. En el origen se indica entre paréntesis el número total de cepas testadas para las muestras de heces y de calzas. <sup>a</sup> indica diferencia significativa entre los resultados obtenidos en cada origen.

Tanto en cepas aisladas de heces como de calzas se detectaron los 5 genes ensayados. De hecho, excepto para los genes *SHV* y *qnrB*, los porcentajes obtenidos fueron similares en ambos orígenes. En el caso de las cepas aisladas de heces, los genes que se observaron con más frecuencia fueron *qnrS* (90%), *TEM* (80%) y *qnrB* (56,67%). En el caso de las calzas, también fueron *qnrS* (93,44%), *TEM* (88,52%) y *qnrB* (83,61%). Solo se encontraron diferencias significativas entre los dos orígenes para los genes *SHV* y *qnrB*. Esto indica que, en cuanto a la presencia de genes de resistencia, las cepas son bastante homogéneas, tanto en heces como en calzas (ambiente), lo que por otra parte es coherente, teniendo en cuenta que la principal fuente de contaminación bacteriana presente en el lecho del recinto proviene de las heces de las aves.

Estos resultados difieren en líneas generales de lo observado en otros estudios. Ceccarelli *et al.* (2019), en un estudio de monitorización de la prevalencia de *E. coli* resistente a cefalosporinas de amplio espectro, observaron los genes *CMY-2* y *SHV* entre los 3 más frecuentes de su estudio, mientras que en nuestro caso estos fueron los 2 menos frecuentes, especialmente *SHV*. Manageiro *et al.* (2017) observaron genes de resistencia de la familia *TEM* en aproximadamente el 33% de las cepas de *E. coli* no sensibles a cefalosporinas, el gen *SHV* en aproximadamente el 46% y solo detectaron el gen *qnrB1* en una cepa. Por su parte, Blaak *et al.* (2015) detectaron genes *TEM* y *SHV* en aproximadamente un 30% de las cepas de *E. coli* con fenotipo ESBL. En cuanto a los genes PMQR, en otros estudios se observaron en niveles más bajos (Jones-Dias *et al.*, 2013) o nulos (Börjesson *et al.*, 2016), mientras que en nuestro estudio se observan tasas de prevalencia mayores al 50%, e incluso superiores al 90%. En el estudio realizado por Clemente *et al.* (2019) los genes ESBL más frecuentemente detectados pertenecían a la familia *CTX-M*, aunque el gen *TEM* también se encontró con mucha frecuencia. Por otra parte, en un estudio realizado por Seo *et al.* (2019) en Corea en las cepas de *E. coli* con fenotipo ESBL detectaron el gen *CMY-2* en todas las cepas, y en una cepa observaron tanto el gen *CMY-2* como el *TEM*.

Las diferencias observadas entre este estudio y los de otros autores puede deberse a la variabilidad de la microbiota de las diferentes manadas de gallinas, que puede verse afectada por una gran cantidad de factores, como el grado de exposición a antibióticos, las poblaciones que pueden colonizar a las aves mediante alimentos o agua, el stock parental del que proceden, además de la variabilidad asociada a cada granja.

En cuanto al número de genes de resistencia observados por cepa, en ambos orígenes se detectó al menos 1 gen de resistencia y el máximo de genes observados en una misma cepa fue de 5 (los 5 genes testados). En el caso de las cepas aisladas de **heces**, las cepas mostraron sobre todo 2 (38,33%) o 3 genes (31,67%). Por otra parte, en las cepas provenientes de **calzas** se detectaron en mayor medida 3 (45,9%) o 4 genes (27,87%) por cepa (Figura 11).

La mayor presencia de cepas con 3 y 4 genes de resistencias antibiótica entre las cepas aisladas de calzas que entre las cepas aisladas de heces refuerza la idea anterior de que, en el ambiente, al convivir poblaciones bacterianas de distinto origen, se da una mayor transferencia genética horizontal.

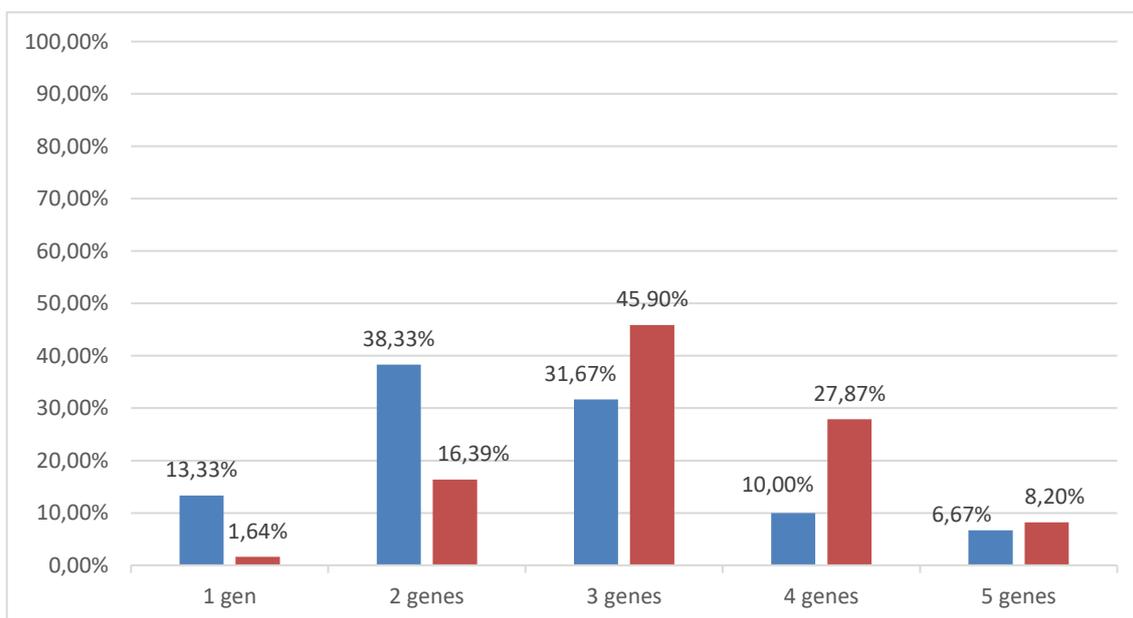


Figura 11. Prevalencia del número de genes de resistencia antibiótica observados en las cepas de *E. coli* aisladas de heces (azul) y calzas (rojo). El número total de cepas testadas fue: 60 cepas para las heces y 61 cepas para las calzas.

Con respecto a los perfiles de resistencia obtenidos, en las cepas aisladas de **heces** se obtuvieron 14 perfiles diferentes. De estos, los más frecuentes fueron “*TEM-qnrS*” (26,67%) y “*TEM-qnrB-qnrS*” (26,67%). Para el resto de los perfiles, la prevalencia fue inferior al 10%. En las cepas aisladas de **calzas** se obtuvieron 12 perfiles distintos, siendo “*TEM-qnrB-qnrS*” (34,43%) y “*SHV-TEM-qnrB-qnrS*” (18,03%) los más observados. Para el resto de los perfiles, al igual que en el caso de los observados en heces, el porcentaje de cepas fue inferior al 10% (Tabla 17).

Tanto en las cepas aisladas de heces como de calzas hay dos perfiles que concentran aproximadamente el 50% de las cepas. En el caso de las cepas aisladas de heces son los perfiles “*TEM-qnrS*” y “*TEM-qnrB-qnrS*”, mientras que en calzas son los perfiles “*TEM-qnrB-qnrS*” y “*SHV-TEM-qnrB-qnrS*”. Esto sugiere, o bien que estos genes se pueden mantener sin comprometer la *fitness* de las cepas y por ello llegan a ser dominantes en las condiciones en las que se criaron las aves, o bien que están asociados a elementos genéticos móviles que ayudan a su transmisión entre cepas. Diversos autores han informado de la asociación entre genes ESBL/AmpC y PMQR (Paterson *et al.*, 2000; Lautenbach *et al.*, 2001; Robicsek *et al.*, 2006), lo que podría explicar la elevada presencia de forma simultánea en una misma cepa de *E. coli* de genes de estas dos familias diferentes. Estas cepas suponen un especial interés debido a que, en condiciones de exposición a antibióticos, se puede favorecer su supervivencia y el fallo de los tratamientos, lo que puede suponer un riesgo para la salud, tanto animal como humana, si estas cepas se transmiten en la cadena de producción.

Perfiles	Heces (N=60)	Calzas (N=61)
<i>TEM</i>	3,33% (2)	1,64% (1)
<i>qnrB</i>	1,67% (1)	-
<i>qnrS</i>	8,33% (5)	-
<i>CMY-qnrB</i>	-	3,28% (2)
<i>CMY-qnrS</i>	3,33% (2)	-
<i>TEM-qnrB</i>	3,33% (2)	-
<i>TEM-qnrS</i>	26,67% (16)	6,56% (4)
<i>qnrB-qnrS</i>	5% (3)	6,56% (4)
<i>CMY-qnrB-qnrS</i>	1,67% (1)	1,64% (1)
<i>SHV-TEM-CMY</i>	1,67% (1)	-
<i>SHV-TEM-qnrS</i>	-	6,56% (4)
<i>TEM-CMY-qnrB</i>	-	1,64% (1)
<i>TEM-CMY-qnrS</i>	1,67% (1)	1,64% (1)
<i>TEM-qnrB-qnrS</i>	26,67% (16)	34,43% (21)
<i>SHV-TEM-qnrB-qnrS</i>	1,67% (1)	18,03% (11)
<i>TEM-CMY-qnrB-qnrS</i>	8,33% (5)	9,84% (6)
<i>SHV-TEM-CMY-qnrB-qnrS</i>	6,67% (4)	8,2% (5)

Tabla 17. Prevalencia de los perfiles de genes de resistencia antibiótica observados en las cepas de *E. coli* aisladas de heces y calzas. N = número total de cepas; entre paréntesis se indica el número de cepas.

## 6. Capítulo 4. Resistencias a antibióticos en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados de dos granjas de gallinas reproductoras

### 6.1. Materiales y métodos

#### 6.1.1. Protocolo de muestreo

Este estudio se realizó en paralelo al estudio realizado en el capítulo 5, muestreando las mismas granjas y partiendo de las mismas muestras.

#### 6.1.2. Aislamiento e identificación de cepas de *Enterococcus spp.*

Una vez homogeneizadas las muestras, se realizaron diluciones decimales seriadas, que se sembraron en placas de Slanetz-Bartley agar (SBA, Slanetz Bartley Agar Base, Scharlab S.L., Spain; TTC 1% Sterile Solution, Scharlab S.L., Spain), un medio selectivo y diferencial para la detección y enumeración de enterococos. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas en aerobiosis. Tras la incubación, se seleccionaron aleatoriamente cepas con la morfología típica para *Enterococcus spp.*, que se resembraron en Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Scharlab S.L., Spain). Tras 24 horas a 37°C, se identificaron como *Enterococcus spp.* mediante la incubación durante 2 horas a 42°C en medio Kanamicina-esculina-azida agar (KAA Agar, Scharlab S.L., Spain) y se seleccionaron las colonias que mostraron ennegrecimiento del agar. Las cepas confirmadas como *Enterococcus spp.* se mantuvieron en BHIA a 4°C hasta su uso.

Una vez las cepas fueron confirmadas como *Enterococcus sp.* se identificó si pertenecían a la especie *E. faecalis* o *E. faecium* mediante mPCR. Para ello, se amplificó un fragmento interno del gen *ddl*, que solo se encuentra en estas dos especies y que codifica para la D-Ala-D-Ala ligasa, usando los iniciadores y condiciones descritos por Depardieu *et al.* (2004).

Iniciador	Especie	Secuencia	Concentración iniciadores	Tamaño amplicón	Referencia
DD13(+)	<i>E. faecalis</i>	CACCTGAAGAAACAGGC	0,4 µM	475	Depardieu <i>et al.</i> (2004)
DD3-2(-)		ATGGCTACTTCAATTCACG	0,4 µM		
FAC1-1(+)	<i>E. faecium</i>	GAGTAAATCACTGAACGA	0,4 µM	1091	
FAC2-1(-)		CGCTGATGGTATCGATTCAT	0,4 µM		

Tabla 18. Iniciadores usados para la identificación de la especie en las cepas de enterococos.

Las mPCR se realizaron en un volumen final de 25 µL con la siguiente concentración de los reactivos: 1x NH<sub>4</sub> Reaction Buffer (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bionline), 0,5 mM de cada dNTP (dNTP Mix 100 mM, Bionline), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bionline), 1,25 U Taq-

DNA polymerase (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline) y la concentración indicada por los autores de cada uno de los iniciadores.

### 6.1.3. Antibiógramas

Se comprobó la sensibilidad a diferentes antibióticos de todas las cepas de *Enterococcus spp.* aisladas. Para ello se empleó la técnica de difusión en disco en agar Mueller-Hinton (Scharlau, Spain), siguiendo las indicaciones del CLSI (2014). Las placas se incubaron a 37°C durante 18h.

La elección de los antibióticos se hizo en base a las indicaciones de EFSA (2008) para la monitorización de resistencias a antibióticos en cepas comensales de *E. coli* y *Enterococcus spp.* aisladas de animales. Los discos con antibióticos (Antimicrobial Susceptibility Test Disc, OXOID Ltd., England, United Kingdom) que se usaron fueron: eritromicina (E) 15 µg, vancomicina (VA) 30 µg, gentamicina (CN) 120 µg, estreptomina (S) 300 µg, quinopristin/Dalfopristin (QD) 15 µg, ampicilina (AMP) 10 µg, tetraciclina (TE) 30 µg, cloranfenicol (C) 30 µg y ciprofloxacino (CIP) 5 µg.

En el caso de los aminoglucósidos, se usaron discos con una carga elevada de antibiótico para determinar la presencia de cepas con elevada resistencia a estos antibióticos ya que, en general, los enterococos presentan una resistencia intrínseca moderada a los aminoglucósidos. Además, en el caso de este grupo de antibióticos, en algunos casos puede parecer que la sustancia es activa *in vitro* y no serlo *in vivo*, excepto a niveles altos del antibiótico.

Respecto a la QD (combinación de estreptograminas A y B), tan solo se consideró el resultado en las cepas de *E. faecium*, ya que *E. faecalis* es intrínsecamente resistente a las estreptograminas A (Cercenado, 2011).

Las cepas destinadas a análisis moleculares en base a los resultados de los antibiógramas se congelaron a -21°C en crioviales (Pro-lab Diagnostics Microbank™).

### 6.1.4. Extracción de DNA

De las cepas que presentaron resistencia a E, QD y/o TE, se extrajo el DNA para la posterior detección de genes de resistencia. Para ello, se usó el kit comercial de extracción de DNA GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. El DNA extraído se conservó a -21°C para su posterior uso.

### 6.1.5. PCRs para la detección de genes de resistencia antibiótica

Se detectaron genes de resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas (MLS) y a tetraciclinas, mediante PCR convencional y múltiple. Los genes MLS que se detectaron fueron *ermA* y *ermB*. En el caso de los genes de resistencia a tetraciclina, se amplificaron secuencias específicas de los genes *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* y *tetS* mediante PCR múltiple. Para ello se usaron

los iniciadores descritos en la Tabla 19. Para la reacción de PCR se usaron las condiciones descritas por los autores.

Iniciadores	Secuencia	Concentración iniciadores	Tamaño amplicón	Referencia
erm(A)-106f	GAA ATY GGR TCA GGA AAA GG	0,5 $\mu$ M	332	Chen <i>et al.</i> (2007)
erm(A)-437r	AAY AGY AAA CCY AAA GCT C	0,5 $\mu$ M		
erm(B)-91f	GAT ACC GTT TAC GAA ATT GG	0,5 $\mu$ M	364	
erm(B)-454r	GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC	0,5 $\mu$ M		
tetK-f	TCG ATA GGA ACA GCA GTA	1,25 $\mu$ M	169	Warsa <i>et al.</i> (1996)
tetK-r	CAG CAG ATC CTA CTC CTT	1,25 $\mu$ M		
tetM-f	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	0,5 $\mu$ M	406	
tetM-r	CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC	0,5 $\mu$ M		
tetL-f	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC	1 $\mu$ M	267	Ng <i>et al.</i> (2001)
tetL-r	GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG	1 $\mu$ M		
tetO-f	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC	1,25 $\mu$ M	515	
tetO-r	TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	1,25 $\mu$ M		
tetS-f	CAT AGA CAA GCC GTT GAC C	0,5 $\mu$ M	667	
tetS-r	ATG TTT TTG GAA CGC CAG AG	0,5 $\mu$ M		

Tabla 19. Iniciadores usados para la detección de los genes de resistencia antibiótica a MLS y tetraciclinas.

Las PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ L con la siguiente concentración de los reactivos: 1x NH<sub>4</sub> Reaction Buffer (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline), 0,5 mM de cada dNTP (dNTP Mix 100 mM, Bioline), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline) en el caso de la PCR para los genes *ermA* y *ermB* mientras que para la PCR de los genes *tet* se usó una concentración de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U Taq-DNA polymerase (BIOTAQ™ DNA Polymerase, Bioline) y la concentración indicada por los autores de cada uno de los iniciadores.

#### 6.1.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software “Statgraphics Centurion XVII” (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia).

Las posibles diferencias significativas entre los resultados se determinaron mediante ANOVA y la prueba de múltiples rangos. En el caso de la ANOVA, se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas, con un nivel de significación del 5%, cuando el p-valor fue inferior a 0,05. Por su parte, para la prueba de múltiples rangos el método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de confianza del 95%.

## 6.2. Resultados y discusión

### 6.2.1. Identificación de las cepas de *Enterococcus spp.*

En total, en el lote A se aislaron un total de 150 cepas, de las que 103 (68,67%) se identificaron como *E. faecium* y 47 (31,33%) como *E. faecalis*. En el lote B, del total de 180 cepas, 160 (88,89%) fueron identificadas *E. faecium* y 20 (11,11%) como *E. faecalis* (Tabla 20).

Los enterococos aislados de las aves del **lote A**, todas las cepas aisladas de los meconios se identificaron como *E. faecalis*. En los aislados procedentes de las pollitas, el porcentaje de *E. faecalis* fue del 20% y el de *E. faecium* del 80%. En las gallinas en fase adulta, el porcentaje de cepas identificadas como *E. faecalis* fue del 8,33% mientras que el de *E. faecium* fue del 91,67%.

En el caso de los enterococos aislados del **lote B**, donde todos los muestreos fueron de gallinas adultas, el porcentaje de cepas identificadas como *E. faecalis* fue del 11,11% mientras que el de *E. faecium* fue del 88.89%.

Los resultados obtenidos están en concordancia con los obtenidos por otros autores. Diarra *et al.* (2010) también aislaron una mayor cantidad de cepas de *E. faecium* en muestras fecales y cecales de pollos de engorde (73,9% de *E. faecium* y 10,1% de *E. faecalis*), al igual que Nowakiewicz *et al.* (2017), quienes encontraron que *E. faecium* era la especie predominante entre los aislados de *Enterococcus*, representando 146 cepas de las 246 aisladas inicialmente.

		<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
Lote A	1 día (30)	100% (30)	0% (0)
	Pollitas (60)	20% (12)	80% (48)
	Adultas (60)	8,33% (5)	91,67% (55)
Lote B	Adultas (180)	11,11% (20)	88,89% (160)

Tabla 20. Distribución de la especie de las cepas de *Enterococcus spp.* aisladas de gallinas reproductoras en función de la edad de las gallinas. Entre paréntesis se indica el número de cepas.

Se aprecia como, a medida que las aves crecen, se producen cambios en las especies predominantes. En este caso se observa un declive en las poblaciones de *E. faecalis* en beneficio de las de *E. faecium*, que pasan a ser las dominantes. Este hecho está en línea con la idea, ya expuesta con anterioridad por otros autores (Kaukas *et al.*, 1987; Devriese *et al.*, 1991), de la existencia de una sucesión en la predominancia de las especies de *Enterococcus* dependiente de la edad de las gallinas, de forma que en un primer momento es *E. faecalis* la especie dominante, pero luego esta es desplazada principalmente por *E. faecium*. Algunos autores (Kaukas *et al.*, 1987) propusieron que esto podía ser debido al uso de tilosina como promotor de crecimiento, ya que *E. faecium* es generalmente resistente. No obstante, en nuestro estudio, la tilosina solo se usó una vez en las gallinas del lote A antes de entrar en fase adulta y con motivos terapéuticos. Además, en Europa no se permite el uso de antibióticos

como promotores de crecimiento, por lo que las gallinas no están constantemente expuestas a la tilosina. Esto sugiere que el motivo de la transición de *E. faecalis* a *E. faecium* no necesariamente está ligado al uso de la tilosina y tal vez podría deberse a cambios fisiológicos o a cambios en las relaciones con las otras especies que conforman la microbiota de las gallinas a medida que transcurre el tiempo.

### 6.2.2. Prevalencia de resistencias a antibióticos

Debido a que todas las cepas aisladas de meconios y un 20% de las cepas aisladas de las pollitas fueron *E. faecalis*, mientras que en el caso de las cepas aisladas de gallinas adultas casi la totalidad de las cepas fueron *E. faecium*, no se pueden comparar los cambios en la frecuencia de las diferentes resistencias a antibióticos en función de la edad de las gallinas. Por otra parte, y debido a las grandes diferencias en el número de cepas de cada especie, tampoco se han comparado las posibles diferencias significativas en las tasas de resistencia para los diferentes antibióticos entre ambas especies, ya que estos resultados, al ser poblaciones con un número de individuos muy distintos, no serían válidos.

En general, se han observado valores más elevados de resistencia frente a los diferentes antibióticos testados en las cepas de *E. faecalis* aisladas de las gallinas del lote A, donde se han observado tasas superiores al 50% para E, CIP C y TE. En el resto de los casos, tanto en cepas de *E. faecalis* aisladas del lote B, como en las cepas de *E. faecium* aisladas tanto del lote A como del B, tan solo se observaron tasas elevadas de resistencia principalmente para la TE y en menor medida para la E.

Para indicar el nivel de resistencia, usamos la clasificación empleada por EFSA (2008): esporádica (<0,1%), muy baja (0,1-1%), baja (>1-10%), moderada (>10-20%), elevada (>20-50%), muy elevada (>50-70%) y extremadamente elevada (>70%).

**En el caso de las cepas de *E. faecalis***, en las cepas aisladas del **lote A**, se observó un nivel extremadamente elevado de resistencia a TE, y muy elevado para C, CIP y E. En las cepas aisladas de las gallinas del **lote B**, se observó un nivel muy elevado para TE y bajo para E (Figura 12).

**Para las cepas de *E. faecium***, en las cepas del **lote A** se observó un valor de resistencia extremadamente elevado para TE, muy elevado para E, bajo para QD y CIP y muy bajo para AMP. En las cepas aisladas del **lote B**, se observó un nivel de resistencia extremadamente elevado para TE, moderado para E y muy bajo para CIP y QD (Figura 13).

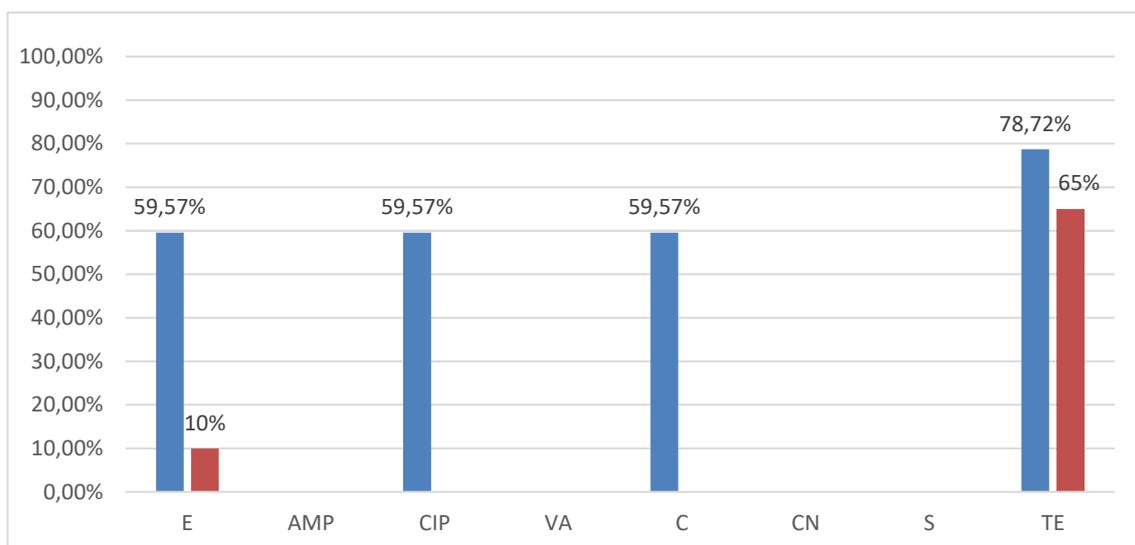


Figura 12. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos testados en las cepas de *E. faecalis* aisladas de las gallinas del lote A (azul) y del lote B (rojo).

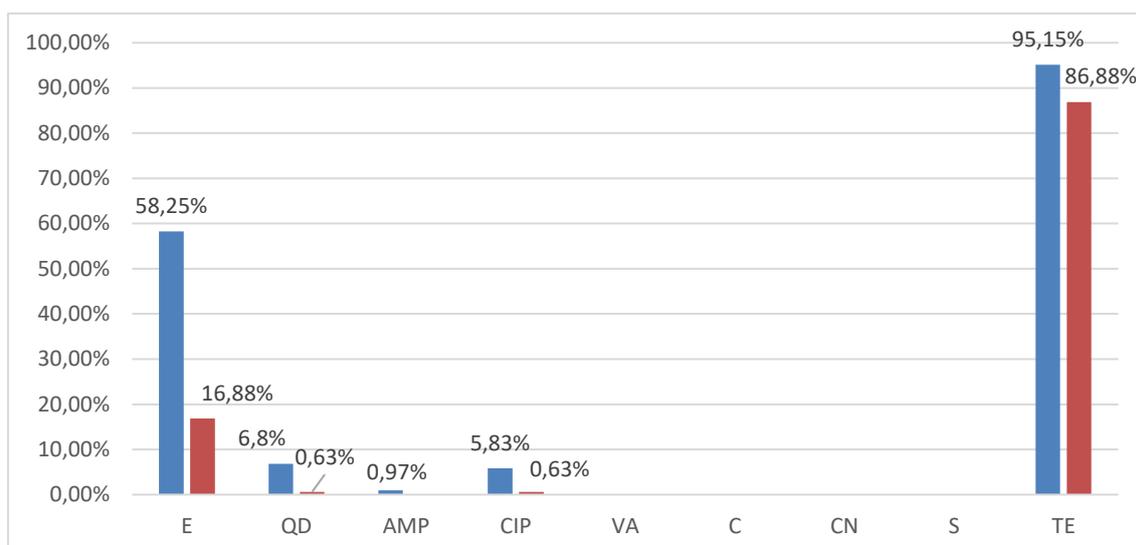


Figura 13. Prevalencia de la resistencia a los diferentes antibióticos testados en las cepas de *E. faecium* aisladas de las gallinas del lote A (azul) y del lote B (rojo).

En general, los resultados obtenidos en nuestro estudio parecen estar de acuerdo con lo expuesto en otros trabajos en cuanto al nivel de resistencia a TE y E. Para el resto de los antibióticos, los resultados varían entre estudios y en función del origen de los aislados. Así, en el informe de EFSA y ECDC (2015), para aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de pollos de engorde durante el 2013 (solo Noruega facilitó datos de gallinas ponedoras), procedentes de la Unión Europea y de estados europeos no miembros, las mayores tasas de resistencias se observaron para TE y E. Para el resto de los antibióticos la prevalencia de las resistencias varió bastante en función de los países. En cuanto a TE, el rango del nivel de resistencias fue de muy elevada a extremadamente elevada para *E. faecalis* y *E. faecium*, y tan solo Dinamarca obtuvo un nivel inferior en aislados de *E. faecalis*. Para E, el rango observado fue de elevada a

extremadamente elevada y para S, de muy baja a elevada en ambas especies. Para *E. faecium*, el rango de resistencia a QD fue de muy elevada a extremadamente elevada y en el caso de AMP, fue de moderada a elevada. Para ambas especies de enterococos, el nivel de resistencia a C y CN fue ausente o bajo. En la mayoría de los aislados de *Enterococcus*, no se observó resistencia a VA, tan solo se observó en un nivel bajo en Croacia en aislados de *E. faecalis* y en *E. faecium* de Bélgica (nivel bajo) y Francia (aislados de 2012) en niveles muy bajos.

Entre los aislados de España, en *E. faecium*, no se observaron resistencias a VA ni C, la resistencia a E fue muy elevada y la resistencia a TE y QD fue extremadamente elevada. En nuestro estudio, en cambio, la resistencia a QD fue entre muy baja y baja. En los aislados de *E. faecalis*, se observó un nivel elevado de resistencias a S y extremadamente elevado a E y TE. Por el contrario, en nuestro caso no se observaron resistencias a S y el rango de resistencia a E fue de bajo a muy elevado.

Por otra parte, Nowakiewicz *et al.* (2017), en su estudio sobre resistencias en *E. faecalis* y *E. faecium* en pollitas de 4 semanas de edad en Polonia, observaron que más de la mitad de las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* (aprox. 54-65%) eran resistentes a TE, y algo más de la mitad de los aislados fueron resistentes a E. Además, obtuvieron un 30% de aislados de *E. faecium* resistentes a CIP. El porcentaje de resistencia a CN que observaron fue bajo, aunque la tasa de elevada resistencia a S sí fue elevada, con cerca del 50% de los aislados de *E. faecalis* y casi el 25% de los de *E. faecium*. Por otra parte, al igual que en nuestro caso, no observaron resistencia a VA ni C. Además, en el caso de la AMP, solo observaron resistencia en 7% de los aislados de *E. faecium*. La resistencia a QD en aislados de *E. faecium* fue muy bajo.

En otro estudio realizado en Europa, de Jong *et al.* (2019) aislaron enterococos procedentes del contenido intestinal de animales de consumo de varios países europeos durante 3 periodos de tiempo (2004-05, 2008-09 y 2013-14). En cepas de *E. faecium* aisladas de pollos, la mayoría de las resistencias se observaron para E (56,3-57%) y TE (77,9-79,1%), mientras que la resistencia a QD fue variable (12,0-29,2%), aunque se observaron reducciones en la resistencia con el tiempo. La resistencia a AMP fue baja, y para CN fue inferior al 2% en todos los periodos. No observaron tampoco resistencia a VA, salvo un 0,3% en el período 2008-09. En los aislados de *E. faecalis*, al igual que en *E. faecium*, la mayoría de las resistencias se observaron para TE, con niveles extremadamente elevados (78,3-80,3%) y a E en un nivel muy elevado (50,9-56,6%). La resistencia a CN fue baja (0,8-9,1%) disminuyendo con el tiempo. No se observaron resistencias a VA ni a AMP, excepto un 0,2% en el período 2013-14 para AMP.

En otros estudios en los que se aislaron *E. faecalis* y *E. faecium* de muestras de aves enfermas (pollos de engorde, gallinas ponedoras y pavos) en Alemania, (Maasjost *et al.*, 2015), todos los aislados de *E. faecalis* fueron sensibles a AMP. Además, no detectaron aislados resistentes a VA. La resistencia a TE fue elevada en ambas especies. También observaron una elevada resistencia a CN en ambas especies, siendo para *E. faecalis* del 35% en los aislados de ponedoras y del 51% en pollos de engorde. No obstante, estos autores no indican si eran o no resistentes a elevados niveles de gentamicina. La resistencia a C fue inferior al 10% en ambas especies.

Entre los aislados de muestras de carne de pollo sí disponemos de estudios, como el de Calonico *et al.* (2018), realizado en Italia, en el que observaron niveles importantes de resistencia a VA (31.3% en *E. faecalis*) y AMP (19,6% en *E. faecium*).

Por el contrario, en otros estudios como el de Kim *et al.* (2018) y el de Hidano *et al.* (2015), las resistencias a VA y AMP, o no se observaron o fueron inferiores al 10%, tanto *E. faecalis* como *E. faecium*. Kim *et al.* (2018), indicaron una tasa de resistencia a CIP del 43% entre los aislados de *E. faecalis*. Entre los aislados de las muestras de carne (Hidano *et al.*, 2015; Calonico *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018), la mayoría de las resistencias se observaron para TE y E en ambas especies y en niveles del entorno de los de nuestro estudio.

Esta variabilidad observada en los niveles de resistencias a los diferentes antibióticos puede deberse a diferencias en la elección de los tratamientos veterinarios y a si está autorizado el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, así como al origen de los aislados.

Centrándonos en nuestros resultados, en las cepas de *E. faecalis* se han observado más resistencias entre las aisladas de las gallinas del lote A que entre las aisladas del lote B. Como se ha indicado anteriormente, en el lote A la mayoría de las cepas de esta especie fueron aisladas de gallinas de 1 día de vida y pollitas, mientras que en el lote B fueron aisladas de gallinas reproductoras adultas. Por ello es posible que las diferencias observadas en la prevalencia de las resistencias tengan su origen en la edad de las gallinas. De hecho, en el caso de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de las mismas gallinas (tal como se ha indicado en capítulos anteriores) también fue en las cepas provenientes de las gallinas tanto de 1 día de vida como de las aisladas de las pollitas donde se observaron mayores tasas de resistencia a los antibióticos testados. Esto sugiere que las poblaciones de las gallinas jóvenes son más proclives a ser resistentes a diferentes antimicrobianos, y que, con el crecimiento de estas, las poblaciones bacterianas cambian. En el caso de las cepas de *E. faecium*, a diferencia de lo observado con las cepas de *E. faecalis*, no se han observado tantas diferencias entre las cepas aisladas de ambos lotes. Teniendo en cuenta que estas cepas se aislaron principalmente de gallinas adultas y pollitas (lote A), se refuerza la idea anterior de que las cepas aisladas de gallinas adultas tienden a presentar una menor carga de resistencias antimicrobianas que aquellas aisladas de gallinas jóvenes.

Tanto en el caso de *E. faecalis* como en el de *E. faecium*, la mayoría de las resistencias, independientemente del lote, se observaron para TE y en menor medida le siguió la resistencia a E, aunque para este la prevalencia varió bastante en función del lote. De hecho, el tratamiento para las infecciones por enterococos en aves incluye penicilina, eritromicina, novobiocina, oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina (Thayer & Waltman, 2013). Además, según el informe del Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (2018), las tetraciclinas son una de las principales clases de antibióticos usados para el tratamiento de infecciones bacterianas en animales y su uso en avicultura supone un 13% del consumo estimado por especies en 2016 para esta clase de antimicrobianos. Respecto a los macrólidos, aunque se usen en menor cantidad que la tetraciclina, su uso en avicultura supone un 14% del total. Esto podría explicar la elevada incidencia de la resistencia a E y TE tanto en nuestro estudio, como en los otros estudios mencionados anteriormente.

Por otra parte, debido a su importancia en medicina humana, destaca la ausencia de resistencia a VA, a altas dosis de aminoglucósidos y a AMP (solo 1 cepa fue resistente). Debido a que las penicilinas se usan frecuentemente en el ámbito clínico para el tratamiento de infecciones por *Enterococcus* (Peters *et al.*, 2003), la ausencia de resistencias a AMP es una buena noticia. De hecho, en el caso de infecciones graves por enterococos, se usan en sinergia combinaciones de aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos (típicamente ampicilina) y gentamicina. Por este motivo, la ausencia de resistencias a estos grupos de antibióticos en los aislados de las gallinas es esperanzadora, ya que reduce en gran manera el riesgo de transmisión a humanos.

En relación con los datos obtenidos en el presente estudio, no parece que la resistencia a antibióticos de relevancia clínica esté muy extendida entre los enterococos aislados en producción animal. De hecho, según Bortolaia *et al.* (2016), la prevalencia de resistencia a AMP es inferior en los aislados de animales y carne que en los provenientes de humanos. No obstante, teniendo en cuenta que los enterococos pueden adquirir mecanismos de resistencia (Hollenbeck & Rice, 2012), es importante mantener la vigilancia sobre las resistencias a antibióticos de importancia clínica para evitar su extensión en la cadena alimentaria.

En el caso de CIP, a pesar de que su actividad frente a los enterococos es moderada (Cercenado, 2011), en el presente estudio tan solo se apreciaron cepas resistentes en el caso de las cepas de *E. faecalis* aisladas del lote A, mientras que en el resto de las cepas aisladas el porcentaje de sensibles fue superior al 50%. Sin embargo, en otros estudios, como el de Diarra *et al.* (2010), sí se observaron prevalencias de resistencia a CIP de aproximadamente el 28% en *E. faecalis* y del 40% en *E. faecium*.

### 6.2.3. Perfiles de resistencias a antibióticos

Los perfiles de resistencias, así como el número de resistencias a antibióticos observadas en cada una de las cepas, variaron en función de la especie y del lote de las gallinas:

**En las cepas de *E. faecalis***, en ambos lotes se observaron más de un 20% de cepas que no mostraron resistencia a ninguno de los antibióticos testados. Además, en el lote B se observaron cepas con menos resistencias que en el lote A: Mientras que en lote A para casi el 60% de las cepas se observaron resistencias a cuatro antibióticos distintos, en el lote B el 55% de las cepas mostraron resistencia solo a un antibiótico.

Por otra parte, **en las cepas de *E. faecium***, el porcentaje de cepas que no mostraron resistencia a ninguno de los antibióticos testados no fue elevado, y se aislaron principalmente del lote B (12,5%). En el lote A, más de la mitad de las cepas presentaron resistencia a dos (44,66%) o tres antibióticos (12,62%), mientras que en el lote B, aproximadamente el 70% de las cepas mostraron resistencia a un solo antibiótico (Tabla 21).

	Lote A		Lote B	
	<i>E. faecalis</i> (47)	<i>E. faecium</i> (103)	<i>E. faecalis</i> (20)	<i>E. faecium</i> (160)
0 R	21,28% (10)	2,91% (3)	35% (7)	12,5% (20)
1 R	19,15% (9)	39,81% (41)	55% (11)	71,25% (114)
2 R	0% (0)	44,66% (46)	10% (2)	15% (24)
3 R	0% (0)	12,62% (13)	0% (0)	1,25% (2)
4 R	59,57% (28)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

Tabla 21. Distribución del número de resistencias por cepa en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de gallinas del lote A y del lote B. Entre paréntesis se indica el número de cepas.

En general, las cepas no mostraron más de 2 resistencias a antibióticos de forma simultánea, aunque la distribución variaba en función de la especie y del lote. Entre las cepas de *E. faecalis* del lote A, casi un 60% de las cepas mostraron 4 resistencias a antibióticos, mientras que el resto, o no mostraron o tan solo mostraron 1. Teniendo en cuenta que casi la totalidad de estas cepas se aislaron de las gallinas de 1 día de vida, y que entre los aislados provenientes de gallinas de mayor edad no se observan tantas resistencias simultáneas, es posible que este fenómeno sea debido a tratamientos iniciales administrados en las incubadoras (de los cuales, en caso de haberlos, no tenemos información).

Entre las cepas de *E. faecium* aisladas del lote A se observaron sobre todo 2, 1 o 3 resistencias, a diferencia de lo que se observa entre las cepas de cualquiera de las dos especies aisladas del lote B, en el que las cepas mostraron en su mayoría 1 resistencia. Teniendo en cuenta que las gallinas del lote B son adultas durante todos los muestreos, se refuerza la idea de que las poblaciones bacterianas de las gallinas jóvenes son más propensas a contener una mayor cantidad de resistencias a antibióticos. Esto se vio también en las cepas de *Escherichia coli* aisladas de las gallinas del lote A, donde se observaron más resistencias entre las gallinas jóvenes que en las adultas.

Diarra *et al.* (2010), en un estudio con enterococos aislados de pollos alimentados con piensos comerciales que contenían antibióticos como promotores de crecimiento, encontraron que todos los aislados eran resistentes al menos a 2 clases diferentes de antibióticos, y más de un 90% lo fueron a 5 o más. Las MR fueron más comunes entre las cepas de la especie *E. faecium*, con un 67% de ellos siendo resistentes a 7 o más antibióticos. Al comparar los resultados de este estudio con los obtenidos por nosotros, parece reforzarse la idea de que la presencia de antibióticos en los piensos, aunque sea a dosis no terapéuticas, favorecen la selección de resistencias. Aunque se ha de tener en cuenta que en su estudio se probaron más antibióticos, lo que incrementa la posibilidad de detectar más resistencias, casi la totalidad de sus aislados fueron resistentes a 5 o más antibióticos, lo que demuestra la importancia de limitar el uso de antibióticos en la medida de lo posible.

A partir de las cepas con al menos una resistencia a algún antibiótico, se elaboraron los perfiles de resistencia (Tabla 22). Se observaron más perfiles entre las cepas de *E. faecium*, donde en función del lote de las gallinas se observaron de 5 (lote B) a 6 (lote A) perfiles distintos. En el caso de las cepas de *E. faecalis*, se observaron tan solo 2 perfiles distintos en ambos lotes. No obstante, se debe tener en cuenta que el número de cepas de *E. faecium* fue

considerablemente superior, por lo que no es de extrañar que se haya observado una mayor variabilidad.

En las cepas de *E. faecalis* aisladas en el lote A se observaron 2 perfiles distintos de resistencias, siendo “E-TE-C-CIP” el más prevalente, observándose en aproximadamente el 75% de las cepas que mostraron resistencias. El otro perfil observado fue “TE” (24,32%). En cuanto a los aislados en el lote B, también se observaron solo 2 perfiles de resistencias, siendo el perfil “TE” el más prevalente (84,62%), seguido de “E-TE” (15,38%).

Respecto a las cepas de *E. faecium*, entre las aislados de las gallinas del lote A se observaron 6 perfiles distintos. De estos, los dos más frecuentes fueron “E-TE” (45%) y “TE” (40%), mientras que el resto se observaron en porcentajes inferiores al 10%. En las cepas aisladas del lote B se observaron 5 perfiles distintos, siendo “TE” (80,71%) y “E-TE” (17,14%) los más frecuentes. El resto de los perfiles se observaron en menos del 1% de las cepas (Tabla 22).

	Lote A		Lote B	
	<i>E. faecalis</i> (47)	<i>E. faecium</i> (103)	<i>E. faecalis</i> (20)	<i>E. faecium</i> (160)
E	0% (0)	1% (1)	0% (0)	0,71% (1)
TE	24,32% (9)	40% (40)	84,62% (11)	80,71% (113)
E-TE	0% (0)	45% (45)	15,38% (2)	17,14% (24)
E-AMP	0% (0)	1% (1)	0% (0)	0% (0)
E-QD-TE	0% (0)	7% (7)	0% (0)	0,71% (1)
E-TE-CIP	0% (0)	6% (6)	0% (0)	0,71% (1)
E-TE-C-CIP	75,68% (28)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

Tabla 22. Perfiles de resistencias observados entre las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas tanto del lote A como del lote B (no se han tenido en cuenta las cepas sin resistencias). Entre paréntesis se indican el número de cepas.

Como se ve en la Tabla 22, para ambas especies y lotes, en todos los perfiles excepto dos de ellos, está presente la resistencia a TE. En las cepas de *E. faecalis* aisladas del lote A, en una gran mayoría de las cepas, la resistencia a TE aparecía asociada a la resistencia a otros 4 antibióticos de diferentes familias. Por el contrario, más del 80% de las cepas que mostraron alguna resistencia, tan solo lo fueron a TE.

Los perfiles observados indican, en general, que las cepas estudiadas no tienen tendencia a acumular resistencias a diversas familias de antibióticos. Por otra parte, cuando se han observado combinaciones de resistencias, siempre aparece TE junto a otros antibióticos, especialmente E. Nowakiewicz *et al.* (2017) observaron también, tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium*, la presencia combinada de resistencia a TE y E en los principales perfiles. Este hecho puede ser indicativo de la presencia de genes de resistencia para estas dos familias de antibióticos en un mismo elemento genético móvil. Hidano *et al.* (2015) describieron en su estudio la asociación entre determinados genes de resistencias a eritromicina con genes de resistencia a tetraciclinas, lo que explicaría la elevada combinación de resistencias a estos dos antibióticos.

Es importante, por tanto, una correcta gestión del uso de los antibióticos en veterinaria ya que, aunque se administren familias de antibióticos de baja importancia para la sanidad humana, es posible que se co-seleccionen resistencias a otros antibióticos y, si los determinantes genéticos se encuentran presentes en algún elemento genético móvil, estas pueden transferirse entre cepas.

En función de los perfiles obtenidos, se han clasificado las cepas como multirresistentes (MR) de acuerdo con las recomendaciones de Magiorakos *et al.* (2012). En el caso de las cepas de *E. faecalis* aisladas del lote A, el porcentaje de MR fue del 59,57% (28 cepas de 47 totales) mientras que de las aisladas del lote B no se observaron cepas MR. En el caso de las cepas de *E. faecium*, en el lote A se observaron un 12,62% de MR (13 cepas de 103 totales) mientras que de las aisladas de las gallinas del lote B el porcentaje fue del 1,25% (2 cepas de 160 totales).

En el informe de EFSA (EFSA & ECDC, 2015), de los estados miembros participantes que aportaron suficiente información como para determinar la prevalencia de MR, se observó que la frecuencia variaba considerablemente entre países, y que de los aislados MR, relativamente pocos incorporaron resistencias a antibióticos de importancia crítica. En *E. faecium*, la mayoría de las MR se observaron en Bélgica (65,8%) y más de la mitad de las cepas MR fueron corresponsivas a E, QD y TE. En el resto de los países las MR fueron más esporádicas. Entre los aislados de *E. faecalis*, la corresponsividad a E y TE se observó en todos los aislados MR, la mayoría de ellos también originarios de Bélgica. No obstante, Austria, Dinamarca y Suecia también informaron de algunos aislados MR. Maasjost *et al.* (2015) en un estudio en Alemania con enterococos aislados de diferentes tejidos de aves de corral, observaron que un 59% de los enterococos (36 de un total de 61) aislados de pollos de engorde, y el 41% (13 de un total de 32) de aislados de gallinas ponedoras eran MR. Nowakiewicz *et al.* (2017) en un estudio en Polonia, observaron que un 56,8% (25 de 44) cepas de *E. faecalis* y un 58,6% (41 de 70) de las cepas de *E. faecium* aisladas de 70 gallinas fueron MR. Al comparar los datos de otros estudios con los obtenidos por nosotros, se aprecia que en nuestro caso la prevalencia de MR es inferior a la descrita por otros autores. Estas discrepancias pueden ser debidas, tanto a las diferencias en el número y el tipo de los antibióticos usados en cada estudio.

A pesar de que, según la bibliografía, es en *E. faecium* donde se observan, en general, más cepas multirresistentes (Cercenado, 2011), en nuestro estudio no ha sido así. De hecho, ha sido entre las cepas de *E. faecalis* donde más MR se han observado. No obstante, la frecuencia de cepas MR detectada podría ser inferior a la real, ya que la cantidad de antibióticos testados ha sido limitada. Además, la diferencia del número total de cepas de cada especie hace que el porcentaje de cepas MR no sea comparable.

#### 6.2.4. Genes de resistencia a antibióticos

A las cepas que mostraron fenotipo resistente a macrólidos (eritromicina) y/o estreptograminas (quinopristin/dalfopristin), se les realizó una PCR para la detección de los genes de resistencia *ermA* y *ermB*, que confieren resistencia a macrólidos, lincosamidas y

estreptograminas (MLS). En total se analizaron 28 cepas de *E. faecalis* y 60 cepas de *E. faecium* aisladas del lote A, así como 2 cepas de *E. faecalis* y 27 cepas de *E. faecium* del lote B.

También se realizó una PCR múltiple para la detección de los genes de resistencia a tetraciclinas *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* y *tetS* en aquellas cepas con resistencia fenotípica a TE: 37 cepas de *E. faecalis* y 98 de *E. faecium* en el lote A, y 13 cepas de *E. faecalis* y 139 cepas de *E. faecium* en el lote B.

**En el caso de las cepas de *E. faecalis***, en el lote A, tanto *ermA* como *ermB* se observaron en el 100% de las cepas analizadas, a pesar de que el gen *ermA* no es tan frecuente como el *ermB* (Torres *et al.*, 2018). En el lote B el gen *ermA* no se detectó, mientras que *ermB* estaba presente en todas las cepas analizadas. Respecto a los genes de resistencia a TE, solo en el caso del gen *tetM* la prevalencia fue muy elevada para ambos lotes (97,3% en el lote A y 84,62% en el B). Para el resto de los genes se observaron diferencias entre ambos lotes: en lote A los mayores porcentajes se observaron para *tetL* y *tetM* (con valores muy superiores al resto de genes tet analizados) mientras que para el resto fueron considerablemente inferiores (*tetK*) o nulos (*tetO* y *tetS*). En el caso del lote B, aunque con porcentajes inferiores a los del lote A, se observaron cepas positivas para casi todos los genes tet, excepto *tetS*. Los mayores porcentajes se obtuvieron para *tetK* y *tetM* (84,62% ambos) seguidos de *tetL* y *tetO* (Figura 14).

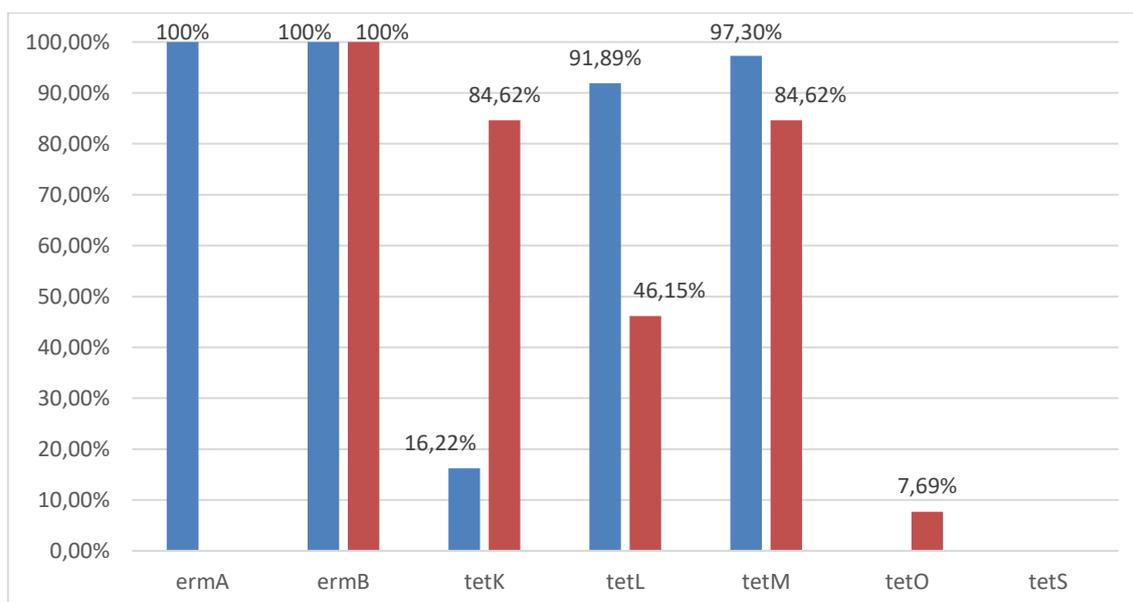


Figura 14. Prevalencia de los diferentes genes de resistencia a antibióticos detectados en las cepas de *E. faecalis*. En azul están representados los porcentajes de cepas positivas para el lote A y en rojo los del lote B.

**En el caso de las cepas de *E. faecium***, el gen *ermB* ha sido el más detectado en ambos lotes. En el lote A, su prevalencia ha sido del 95%, mientras que en lote B ha sido notablemente inferior (33,33%). El porcentaje de cepas positivas para el gen *ermA* ha sido muy bajo, y solo se han observado positivos en el lote A (5%). Con respecto a los genes de resistencia a TE, en ambos orígenes se han observado porcentajes de entre el 81,29-88,78% de las cepas analizadas para los genes *tetK*, *tetL* y *tetM*, mientras que el gen *tetO* solo se ha observado en el lote B (0,72%) y el *tetS* en el lote A (1,02%) (Figura 15).

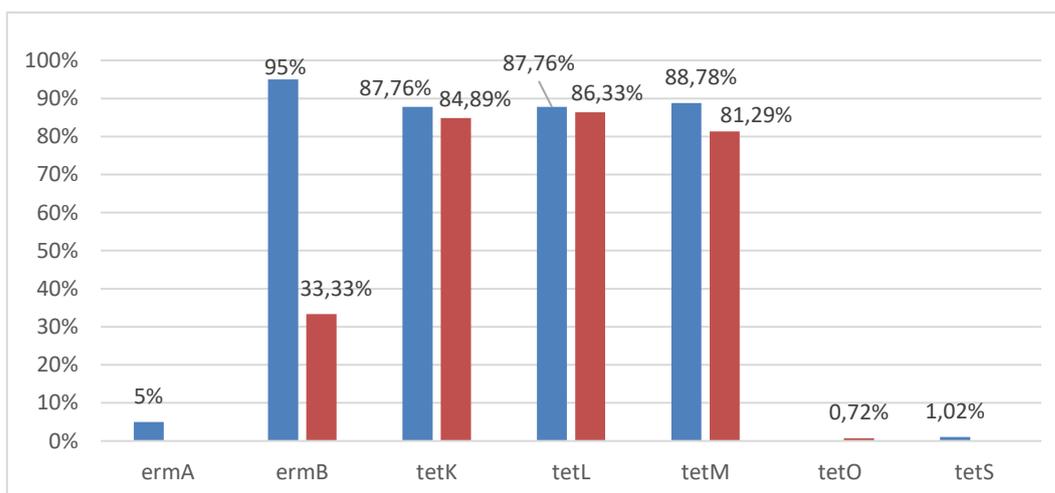


Figura 15. Prevalencia de los diferentes genes de resistencia a antibióticos detectados en las cepas de *E. faecium*. En azul están representados los porcentajes de cepas positivas para el lote A y en rojo los del lote B.

Al comparar los resultados obtenidos con los de otros autores, vemos que, en líneas generales, están en concordancia. Diarra *et al.* (2010), en un estudio en Canadá con cepas aisladas de pollos de engorde, no detectaron la presencia del gen *ermA* en *E. faecalis* (7 cepas) mientras que la prevalencia de *ermB* fue elevada (71,4%). En cuanto a los genes *tet*, *tetL* y *tetM* se observaron en algo más de la mitad de las cepas de forma simultánea. Por otro lado, no observaron el gen *tetO*. En las cepas de *E. faecium* (51 cepas totales), solo detectaron el gen *ermA* en una cepa, mientras que *ermB* estaba presente en un 43,1% de las cepas. De los genes *tet*, el más detectado fue *tetM*, con casi el 95% de cepas positivas, seguido de *tetL* en aproximadamente el 75% de las cepas. La presencia conjunta de estos genes fue detectada el 72,5% de las cepas. Tampoco detectaron la presencia del gen *tetO*.

Nowakiewicz *et al.* (2017) observaron en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de gallinas de granjas en Polonia (44 y 70 cepas respectivamente), que en la mayoría de los casos la resistencia a E estaba mediada por el gen *ermB*. En el caso de los aislados de *E. faecium*, se detectó también la presencia de los genes *tetM* y *tetL*, mientras que el *tetO* no se detectó en las cepas de esta especie. Por el contrario, los aislados de *E. faecalis* se caracterizaban por la presencia del gen *tetO* y una menor presencia de los genes *tetM* y *tetL*.

Kim *et al.* (2018) en un estudio en Corea del Sur sobre 149 cepas de *E. faecalis* co-resistentes a E y TE originarias de pollos, determinaron la presencia de los genes *ermA*, *ermB*, *tetL*, *tetM* y *tetO*. La prevalencia de los genes *ermA* y *tetO* fue baja, mientras que los genes *ermB*, *tetM* y *tetL* se observaron en la mayoría de las cepas testadas. La prevalencia de *ermB* fue del 96%, la de *tetM* del 95,3% y la de *tetL* del 89,3%. Además, un 81,2% de los aislados eran positivos para *ermB*, *tetL* y *tetM*.

Por su parte, en un estudio llevado a cabo en productos avícolas de Japón, Hidano *et al.* (2015) observaron en aislados de *E. faecalis* (113 cepas) los genes *tetL* (46%), *tetM* (33,6%), *ermB* (28,3%) y *tetO* en menor medida (13,3%). En los aislados de *E. faecium* (25 cepas), observaron *tetL* (24%), *tetM* (20%) y *ermB* (8%). No detectaron el gen *ermA*.

Por lo que se observa, tanto en nuestro estudio como en los de otros autores, el gen *ermA* no es frecuente entre los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium*, mientras que el *ermB* está muy

extendido. De hecho, a pesar de la existencia de diferentes genes de resistencia a macrólidos, *ermB* es el gen el más común a nivel mundial (Torres *et al.*, 2018).

En algunas cepas con resistencia a E y/o QD no se detectó la presencia de genes de resistencia *ermA* ni *ermB*, por lo que la resistencia podría estar conferida por otros genes de resistencia diferentes.

En cuanto a los genes de resistencia a tetraciclinas, los principales genes observados en nuestro estudio han sido los genes *tetK*, *tetL* y *tetM*. Según Torres *et al.* (2018) los principales genes de resistencia a tetraciclinas presentes en el género *Enterococcus* son los asociados a la protección del ribosoma, siendo los genes *tetM*, *tetO* y *tetS* los más frecuentes de este tipo, y los asociados al eflujo del antibiótico o la inactivación enzimática, destacando los genes *tetK* y *tetL*. No obstante, en las dos especies analizadas, tanto en nuestro estudio como en los descritos anteriormente, los genes que se han observado con mayor frecuencia en estas dos especies son *tetL* y *tetM*. Algunos autores (Huys *et al.*, 2004; Schwaiger *et al.*, 2009; Hidano *et al.*, 2015) ya sugirieron la presencia de una asociación positiva entre los genes *tetL* y *tetM*. Además, Hidano *et al.* (2015) indica la presencia de una asociación negativa entre el gen *tetM* y *tetO* y sugieren en base a las observaciones de Blake *et al.* (2003) que la presencia de dos genes de resistencia con el mismo mecanismo de acción aportaría poco beneficio a las cepas. Esto explicaría la baja prevalencia del gen *tetO* cuando el *tetM* es muy frecuente.

Lote	PCR	Perfil	%
A	tet (9)	-	11,11% (1)
		<i>tetL-tetM</i>	44,44% (4)
		<i>tetK-tetM</i>	22,22% (2)
		<i>tetK-tetL-tetM</i>	22,22% (2)
	MLS-tet (28)	<i>ermA-ermB-tetK-tetL-tetM</i> <i>ermA-ermB-tetL-tetM</i>	7,14% (2) 92,86% (26)
B	tet (11)	<i>tetK-tetL</i>	9,09% (1)
		<i>tetK-tetL-tetM</i>	36,36% (4)
		<i>tetK-tetM</i>	45,45% (5)
		<i>tetM</i>	9,09% (1)
	MLS-tet (2)	<i>ermB-tetK-tetL-tetM</i> <i>ermB-tetO</i>	50% (1) 50% (1)

Tabla 23. Perfiles de genes de resistencia observados en función de las PCR realizadas a las cepas de *E. faecalis* aisladas de las gallinas de los lotes A y B. Entre paréntesis se indica en número de cepas.

A partir de los resultados de las PCR se obtuvieron los perfiles de genes de resistencia.

**En las cepas de *E. faecalis* aisladas del lote A**, entre las cepas a las que solo se les buscaron genes de resistencia a tetraciclina (tet) se observó una cepa negativa para todos los genes testados. En el resto de las cepas, se observó la combinación de los genes “*tetL-tetM*” (44,44%) y de los genes “*tetK-tetM*” y “*tetK-tetL-tetM*” (22,22% cada uno). En las cepas a las que se les realizaron PCR para la detección de genes de resistencia a MLS y a tetraciclinas (MLS-tet) se observó en un 92,86% de las cepas la combinación de los genes “*ermA-ermB-tetL-tetM*”. En las cepas aisladas del **lote B**, a las que tan solo se les realizó la PCR de genes tet, los dos perfiles

más observados fueron “*tetK-tetM*” (45,45%) y “*tetK-tetL-tetM*” (36,36%). En cuanto a las cepas a las que se les realizaron PCR para la detección de genes de resistencia a MLS-tet, se detectaron 2 perfiles distintos, uno para cada una de las 2 cepas (Tabla 23).

Lote	PCR	Perfil	%
A	MLS (2)	<i>ermB</i>	100% (2)
		<i>tetK-tetL</i>	20% (8)
	tet (40)	<i>tetK-tetL-tetM</i>	55% (22)
		<i>tetK-tetM</i>	15% (6)
		<i>tetL</i>	2,5% (1)
		<i>tetL-tetM</i>	7,5% (3)
		<i>ermA-ermB-tetK-tetL-tetM</i>	1,72% (1)
	MLS-tet (58)	<i>ermA-ermB-tetL-tetM</i>	1,72% (1)
		<i>ermA-tetM</i>	1,72% (1)
		<i>ermB-tetK-tetL</i>	5,17% (3)
		<i>ermB-tetK-tetL-tetM</i>	67,24% (39)
		<i>ermB-tetK-tetL-tetM-tetS</i>	1,72% (1)
		<i>ermB-tetK-tetM</i>	6,9% (4)
		<i>ermB-tetL-tetM</i>	10,34% (6)
		<i>tetK-tetL-tetM</i>	3,45% (2)
B	MLS (1)	-	100% (1)
		<i>tetK-tetL</i>	13,27% (15)
	tet (113)	<i>tetK-tetL-tetM</i>	68,14% (77)
		<i>tetK-tetM</i>	4,42% (5)
		<i>tetL</i>	0,88% (1)
		<i>tetL-tetM</i>	2,65% (3)
		<i>tetL-tetO</i>	0,88% (1)
		<i>tetM</i>	9,73% (11)
		MLS-tet (26)	<i>ermB-tetK-tetL</i>
	<i>ermB-tetK-tetL-tetM</i>		23,08% (6)
	<i>ermB-tetK-tetM</i>		7,69% (2)
	<i>tetK-tetL</i>		15,38% (4)
	<i>tetK-tetL-tetM</i>		34,62% (9)
	<i>tetL</i>		11,54% (3)
		<i>tetM</i>	3,85% (1)

Tabla 24. Perfiles de genes de resistencia observados en función de las PCR realizadas a las cepas de *E. faecium* aisladas de las gallinas de los lotes A y B. Entre paréntesis se indica en número de cepas.

Respecto a las cepas de *E. faecium*, en las cepas aisladas del lote A, en las que solo se buscó la presencia de genes de resistencia a MLS, se detectó en todas únicamente el gen *ermB*. En las cepas en las que se buscaron genes de resistencia a tetraciclinas y MLS (MLS-tet), el 67,24% presentó la combinación “*ermB-tetK-tetL-tetM*”. El resto de los perfiles fueron muy inferiores (Tabla 24). En las cepas aisladas de las gallinas del lote B, la cepa a la que solo se le hizo la PCR de detección de genes de resistencia a MLS no mostró ninguno de los 2 genes analizados. En las cepas en las que solo se buscó la presencia de genes de resistencia tet, el perfil que se observó en el 68,14% de estas fue “*tetK-tetL-tetM*”, siendo los otros perfiles mucho menos frecuentes. Por último, para las cepas a las que se les realizaron las PCR de detección de genes

de resistencia a MLS y tetraciclinas, los principales perfiles obtenidos fueron “*tetK-tetL-tetM*” (34,62%), “*ermB-tetK-tetL-tetM*” (23,08%), “*tetK-tetL*” (15,38%) y “*tetL*” (11,54%) (Tabla 24).

En casi la totalidad de las cepas se detectó la presencia de varios genes de resistencia, especialmente entre los genes *tet*. En las cepas de *E. faecalis* a las que solo se realizó la PCR para la detección de los genes *tet*, se observa la presencia del gen *tetM* en combinación con los otros genes, especialmente *tetK* y *tetL*. Entre las cepas a las que se les realizó la PCR para la detección de genes *tet* y *erm*, se observó también la asociación de estos genes, en especial los *ermB* y *tetK*, *tetL* y *tetM*.

Entre las cepas de *E. faecium*, en las cepas a las que solo se les identificaron los genes *tet*, la asociación que más se observó, independientemente del lote, fue la de los genes *tetK*, *tetL* y *tetM*. Por último, en las cepas en las que se buscaron ambas familias de genes, la combinación más frecuentemente observada fue la de los genes *ermB*, *tetK*, *tetL* y *tetM*. Lo expuesto sugiere que la presencia en solitario de genes de resistencia antibiótica no es común y que estos suelen presentar asociaciones. Estas asociaciones también se han observado entre genes de resistencia a macrólidos y genes de resistencia a tetraciclinas. Hidano *et al.* (2015) informaron de una asociación positiva entre los genes *ermB* y *tetL*. De hecho, la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas en cepas con el gen *ermB* se da con frecuencia y, algunos autores indican que puede ser debido a que se encuentren presentes en un mismo plásmido (Tremblay *et al.*, 2011). Radhouani *et al.* (2011) han observado también cómo diferentes especies de bacterias Gram positivas contienen frecuentemente el transposón conjugativo móvil Tn1545 que contiene los genes *tetM* y *ermB*. Por último, Nowakiewicz *et al.* (2017) detectaron la presencia de diferentes transposones en cepas positivas para los genes *ermB* y *tetM* y sugirieron que la resistencia a tetraciclinas asociadas con el gen *tetM* pueden ser transferibles por transposones conjugativos. Esto hace que sea importante considerar que se pueden seleccionar resistencias a antibióticos para los que no se ha aplicado presión selectiva mediante la co-selección de genes de resistencia. De hecho, Marosevic *et al.* (2014) observaron una expansión de determinantes genéticos para la resistencia a MLS tanto en grupos de pollos tratados con antibióticos pertenecientes a este grupo (lo que conformarían una presión selectiva) como con antibióticos de diferente clase.

## 7. Conclusiones

1. La contaminación microbiana en huevos producidos y comercializados en España es baja.
2. En cepas de *E. coli* aisladas tanto de huevos ecológicos como domésticos se observa una mayor diversidad de patrones de resistencias antimicrobianas que en huevos convencionales.
3. La mayoría de las cepas de *E. coli* multirresistentes se observan en huevos ecológicos.
4. En condiciones experimentales, se observan elevados niveles de cepas de *E. coli* resistentes en pollos de 1 día de vida no expuestos a antibióticos. Ello pone de manifiesto la posibilidad de la transmisión vertical desde los grupos parentales.
5. El tratamiento experimental con amoxicilina se relaciona con un incremento de resistencias a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y cloranfenicol. Esto destaca la importancia de tomar medidas centradas en la reducción del uso de antibióticos durante la producción.
6. La prevalencia de resistencias a antibióticos en *E. coli* aisladas de gallinas reproductoras disminuye a medida que estas crecen.
7. Se observa una elevada presencia de resistencias a cefalosporinas en los aislados procedentes de gallinas de 1 día de vida, reforzando la sospecha de un uso *off-label* de cefalosporinas en las incubadoras.
8. Existe una presencia importante de cepas de *E. coli* multirresistentes en gallinas de todos los rangos de edad.
9. Las cepas de *E. coli* aisladas de gallinas reproductoras adultas en granjas con bajo uso de antibióticos muestran una baja prevalencia de resistencias a antibióticos.
10. Tanto la presencia de genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos como la elevada presencia de multirresistencias, son indicativas de la posible expansión de resistencias a antibióticos por transferencia horizontal en la microbiota de los animales y en el ambiente de las granjas.
11. Nuestros resultados muestran una elevada presencia de genes de resistencia a cefalosporinas y a quinolonas en cepas de *E. coli* aisladas de gallinas reproductoras. Además, la elevada presencia de ambas clases de genes en las mismas cepas refuerza la idea de que los genes de resistencia a cefalosporinas suelen asociarse a genes de resistencia a quinolonas.
12. Se han observado diferencias en la prevalencia de los genes de resistencia entre nuestro estudio y otros trabajos similares, lo que sugiere que las diferencias propias de cada explotación pueden contribuir al grado de prevalencia y tipo de genes de resistencia más frecuentes en las mismas.

13. En las cepas de *E. coli* procedentes de granjas reproductoras se han observado con frecuencia más de 2 genes de resistencia a antibióticos y la presencia conjunta de genes ESBL y PMQR. Esto podría favorecer la co-selección de bacterias resistentes a ambos tipos de antibióticos incluso en ausencia de exposición a uno de ellos.
14. La elevada prevalencia de los genes *tetA* y TEM en cepas de *E. coli* puede ser indicativo de una asociación de ambos en los mismos elementos genéticos móviles.
15. En los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* procedentes de gallinas reproductoras jóvenes se encuentran una mayor cantidad de resistencias a antibióticos que en las adultas.
16. La prevalencia general de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a antibióticos no es elevada, excepto para la resistencia a tetraciclina y, en menor medida, a eritromicina.
17. En *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de gallinas, las multirresistencias no son frecuentes.
18. En concordancia con los perfiles de resistencias detectados, los genes de resistencia más observados en los enterococos han sido *ermB*, *tetK*, *tetL* y *tetM*.
19. En general, en las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* se detectan varios genes de resistencia, tanto de la misma familia como de distinta, en un mismo aislado, lo que indica la presencia de una posible co-selección de resistencias a antibióticos.

---

## Bibliografía

- Abraham , E. P., Chain , E., Fletcher , C. M., Florey , H. W., Gardner , A. D., Heatley , N. G., & Jennings , M. A. (1992). Further observations on penicillin. 1941. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *42*(1), 3-9.
- Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, *146*, 837.
- Adesiyun, A., Offiah, N., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V., & Musai, L. (2007). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs. *Food Control*, *18*, 306-311.
- Adesiyun, A., OYah, N., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V., & Musai, L. (2006). Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs. *Food Research International*, *39*, 212-219.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, *53*, 1565-1574. doi:10.1021/bi5000564
- Alvarez, M., Tran, H. J., Chow, N., & Jacoby, G. A. (2004). Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*, 533-537.
- Álvarez-Fernández, E., Domínguez-Rodríguez, J., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of housing systems on microbial load and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from eggs produced for human consumption. *Journal of Food Protection*, *5*, 847-853.
- Ambler , R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *289*(1036), 321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
- Anderson, V. E., Zaniewski, R. P., Kaczmarek, F. S., Gootz, T. D., & Osheroff, N. (1999). Quinolones inhibit DNA religation mediated by *Staphylococcus aureus* topoisomerase IV. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 35927-35932. doi:10.1074/jbc.274.50.35927
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *8*, 260-271.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., & Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to chicken. *World's Poultry Science Journal*, *60*, 223-232.
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 266-278. doi:10.1038/nrmicro2761

- Arias, C. A., Contreras, G. A., & Murray, B. E. (2010). Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *16*, 555-562. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x
- Baquero, F., & Cantón, R. (2017). Evolutionary biology of drug resistance. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial drug resistance. Mechanisms of drug resistance, Volume 1* (2nd ed., pp. 9-36). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4\_2
- Baron, S., Jouy, E., Larvor, E., Eono, F., Bougeard, S., & Kempf, I. (2014). Impact of Third-Generation Cephalosporin Administration in Hatcheries on Fecal *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Broilers and Layers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*, 5428–5434.
- Baron, S., Jouy, E., Touzain, F., Bougeard, S., Larvor, E., de Boisseson, C., . . . Kempf, I. (2016). Impact of the administration of a third-generation cephalosporin (3GC) to one-day-old chicks on the persistence of 3GC-resistant *Escherichia coli* in intestinal. *Veterinary Microbiology*, *185*, 29-33.
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2012). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *8*, 492-499.
- Binnewies, T., Motro, Y., Hallin, P., Lund, O., Dunn, D., La, T., . . . Ussery, D. (2006). Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Functional & Integrative Genomics*, *6*, 165-185.
- Blaak, H., Hamidjaja, R. A., van Hoek, A. H., de Heer, L., de Roda Husman, A. M., & Schets, F. M. (2014). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*, 239-246.
- Blaak, H., van Hoek, A. H., Hamidjaja, R. A., van der Plaats, R. Q., Kerkhof-de Heer, L., de Roda Husman, A. M., & Schets, F. M. (2015). Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLOS ONE*, *10*(8), e0135402. doi:10.1371/journal.pone.0135402
- Blake, D. P., Humphry, R. W., Scott, K. P., Hillman, K., Fenlon, D. R., & Low, J. C. (2003). Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(6), 1087-1097.
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miró, E., . . . Llagostera, M. (2006). ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, *118*(3-4), 299-304. doi:10.1016/j.vetmic.2006.08.002

- Borges, C. A., Beraldo, L. G., Cardozo, M. V., Barboza, K. B., & Avila, F. A. (2013). Prevalence and characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in wild birds and pigeons. *Abstracts of the 5th FEMS Congress of European Microbiologists, Advancing Knowledge on Microbes*, 82. Leipzig, Alemania.
- Börjesson, S., Guillard, T., Landén, A., Bengtsson, B., & Nilsson, O. (2016). Introduction of quinolone resistant *Escherichia coli* to Swedish broiler population by imported breeding animals. *Veterinary Microbiology*, 194, 74-78.
- Bortolaia, V., & Guardabassi, L. (2015). Zoonotic transmission of antimicrobial resistant enterococci: a threat to public health or an overemphasised risk? In A. Sing (Ed.), *Zoonoses: Infections affecting men and animals – a focus on public health aspects* (pp. 407-431). Dordrecht: Springer Netherlands.
- 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, 179-386.
- Bortolaia, V., Espinosa-Gongora, C., & Guardabassi, L. (2016). Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, 130-140.
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., & Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103(7), 1143-1154. doi:0.1016/s0092-8674(00)00216-6
- Brown, E. E., Cooper, A., Carrillo, C., & Blais, B. (2019). Selection of multidrug-resistant bacteria in medicated animal feeds. *Frontiers in Microbiology*, 10, 456. doi:10.3389/fmicb.2019.00456
- Bush, K. (2017). The importance of  $\beta$ -lactamases to the development of new  $\beta$ -lactams. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial drug resistance. Mechanisms of drug resistance, volume 1* (2nd ed., pp. 165-176). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4
- Bush, K., & Fisher, J. F. (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 65, 455-478. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102911
- Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., Jong, A., Marion, H., McConville, M. R., . . . Walters., J. (2004). A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 744–754.
- Calonico, C., Pesavento, G., Delfino, V., Forni, S., & Lo Nostro, A. (2018). Prevalence of antibiotic resistance in enterococci: A 14 year survey. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6, 626-637.

- Cambray, G., Guerout, A. M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, *44*, 141-166. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163504
- Cantón, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinions in Microbiology*, *9*, 466-475.
- Cantón, R., & Morosini, M. I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*, 977-991. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x
- Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, *11*, 477-485. doi:10.1016/j.coph.2011.07.007
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., & Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, *103*, 1366-1375.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(6), 2227-2238. doi:10.1128/AAC.01707-08
- Casella, T., Nogueira, M. C., Saras, E., Haenni, M., & Madec, J. Y. (2017). High prevalence of ESBLs in retail chicken meat despite reduced use of antimicrobials in chicken production, France. *International Journal of Food Microbiology*, *257*, 271-275. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.005
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*, 394-397.
- Cattoir, V., Weill, F. X., & Poirel, L. (2007). Prevalence of qnr genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*, 751-754.
- CDC. (2014). *E. coli (Escherichia coli)*. Consultado el 2 de octubre de 2019, en <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
- CDC. (2019). *NARMS. CDC*. Consultado el 5 de octubre de 2019, en <https://www.cdc.gov/narms/index.html>
- Ceccarelli, D., Kant, A., van Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Hordijk, J., Wit, B., . . . Veldman, K. T. (2019). Diversity of plasmids and genes encoding resistance to extended spectrum cephalosporins in commensal *Escherichia coli* from Dutch livestock in 2007–2017. *Frontiers in Microbiology*, *10*.
- Cercenado, E. (2011). *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *29*, 59-65.
- Chauvin, C., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Cornec, M., Francart, S., & Marois-Créhan. (2013). National prevalence of resistance to third-generation cephalosporins in *Escherichia coli*

- isolates from layer flocks in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 6351-6353.
- Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in livestock manure manure and management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4407-4416.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- Chousalkar, K. K., Flynn, P., Sutherland, M., R., R. J., & Cheetham, B. F. (2010). Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effects of translucency on bacterial penetration in eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 207-213.
- Clemente, L., Manageiro, V., Correia, I., Amaro, I., Albuquerque, T., Themudo, P., . . . Caniça, M. (2019). Revealing *mcr-1*-positive ESBL-producing *Escherichia coli* strains among Enterobacteriaceae from food-producing animals (bovine, swine and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010–2015. *International Journal of Food Microbiology*, 296, 37-42.
- CLSI. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24*. Wayne, PA, USA.
- Codex. (2011). Guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance. *Codex Alimentarius Commission/Guidelines CAC/GL 77-2011*. Accesible desde <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/antimicrobial/en/>
- Collignon, P. C., Conly, J. M., Andremont, A., McEwen, S. A., Aidara-Kane, A., & for the World Health Organization Advisory Group, B. M.-A. (2016). World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine:a critical step for developing risk management strategiesto control antimicrobial resistance from food animalproduction. *Clinical Infectious Diseases*, 63(8), 1087–1093. doi:10.1093/cid/ciw475
- Colom, K., Perez, J., Alonso, R., Fernandez-Aranguiz, A., Larino, E., & Cisterna, R. (2003). Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*TEM, *bla*(SHV) and *bla*OXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Letters*, 223, 147-151.
- D'Costa, V. M., & Wright, G. D. (2017). Biochemical logic of antibiotic inactivation and modification. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial drug resistance. Mechanisms of drug resistance, Volume 1* (2nd ed., pp. 97-114). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4

- Dame-Korevaar, A., Fischer, E., Stegeman, A., Mevius, D., van Essen-Zandbergen, A., Velkers, F., & van der Goot, J. (2017). Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. *Veterinary Microbiology*, *203*, 211-214.
- Datta, N., & Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*, *208*, 239-241. doi:10.1038/208239a0
- Davis, G. S., Waits, K., Nordstrom, L., Grande, H., Weaver, B., Papp, K., . . . Price, L. B. (2018). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiology*, *18*, 174. doi:0.1186/s12866-018-1322-5
- de Jong, A., Simjee, S., Rose, M., Moyaert, H., El Garch, F., & Youala, M. (2019). Antimicrobial resistance monitoring in commensal enterococci from healthy cattle, pigs and chickens across Europe during 2004–14 (EASSA Study). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(4), 921-930. doi:10.1093/jac/dky537
- Depardieu, F., Perichon, B., & Courvalin, P. (2004). Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*, 5857-5860.
- Dessie, H. K., Bae, D. H., & Lee, Y. J. (2013). Characterization of integrons and their cassettes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from poultry in Korea. *Poultry Science*, *92*, 3036-3043.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Wijnfels, R., & Haesebrouck, F. (1991). Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, *71*(1), 46-50.
- Dhillon, A. S., & Jack, O. K. (1996). Two outbreaks of colibacillosis in commercial caged layers. *Avian Disease*, *40*, 742-746.
- Diarra, M. S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., & Topp, E. (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus spp.* and characterization of isolates from broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*, *76*, 8033-8043.
- 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*(11), e79005. doi:10.1371/journal.pone.0079005
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., & Mevius, D. (2010). Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Veterinary Microbiology*, *145*(3-4), 273-278. doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.019
- Doménech, E., Jimenez-Belenguer, A., Perez, R., Ferrus, M., & Escriche, I. (2015). Risk characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* in meat products. *Food Control*, *57*, 18-23.

- Dorado-García, A., Smid, J. H., van Pelt, W., Bonten, M. J., Fluit, A. C., van den Bunt, G., . . . Heederik, D. J. (2018). Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 339-347. doi:10.1093/jac/dkx397
- Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L. K., Avery, B., Boerlin, P., . . . Pillai, D. R. (2010). Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 48-54.
- ECDC. (2018a). *Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria still high in humans, animals and food, say ECDC and EFSA*. Consultado el 17 de octubre de 2019, en <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/antimicrobial-resistance-zoonotic-bacteria-still-high-humans-animals-and-food-say-ecdc>
- ECDC. (2018b). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017*. Consultado el 1 de octubre de 2019, en <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017>
- ECDC. (2019). *The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017*. Consultado el 20 de octubre desde 2019, en <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-summary-report-antimicrobial-resistance-zoonotic-and-indicator-5>
- ECDC. (s.f.). *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Consultado el 30 de septiembre de 2019, en <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-networks-and-laboratory-networks/ears-net-about>
- EFSA. (2008). Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* from food animals. *The EFSA Journal*(141), 1-44.
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*, 9, 2322.
- EFSA. (2014). EFSA explains zoonotic diseases. *Salmonella*. Fact sheet. Consultado en [https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheet\\_salmonella.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheet_salmonella.pdf)
- EFSA & ECDC. (2012). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. *EFSA Journal*, 10(3), 2598.[233pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2012.2598
- EFSA & ECDC. (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*, 11(5), 359 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3196

- EFSA & ECDC. (2015). EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, *13*, 178 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4036
- EFSA & ECDC. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, *14*(12), 231pp.
- EFSA & ECDC. (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal*, *17*(2), 5598, 278 pp. doi:10.2903/j.efsa.2019.5598
- EFSA. (s.f.). *Antimicrobial resistance*. European Food Safety Authority. Consultado el 30 de septiembre de 2019, en <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/antimicrobial-resistance>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) and EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2012). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). *EFSA Journal*, *10*(6). doi:10.2903/j.efsa.2012.2741
- EFSA & ECDC. (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal*, *16*(2), 270pp. doi:10.2903/j.efsa.2018.5182
- Egea, P., López-Cerero, L., Navarro, M. D., Rodríguez-Baño, J., & Pascual, A. (2011). Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. *European Journal of Clinical Microbiology*, *30*, 1045-1047.
- Egea, P., López-Cerero, L., Torres, E., Gómez-Sánchez, M. C., Serrano, L., Navarro Sánchez-Ortiz, M. D., . . . Pascual, A. (2012). Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *International Journal of Food Microbiology*, *159*(2), 69-73. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.002
- Emmerson, A. M., & Jones, A. M. (2003). The quinolones: Decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(Suppl.1), 13–20. doi:10.1093/jac/dkg208
- Enne, V. I. (2010). Reducing antimicrobial resistance in the community by restricting prescribing: can it be done? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*, 179–82.
- España. (2008). REAL DECRETO 226/2008, de 15 de febrero, por el que se regulan las condiciones de aplicación de la normativa comunitaria de comercialización de huevos.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2011). Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. *Euro surveillance*, *16*.
- European Commission. (2003). Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition, replacing Directive 70/524/EEC on additives in feeding-stuffs. Consultado en

- noviembre de 2015, en <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32003R1831>
- European Commission. (2010). Progress report on the Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance. Brussels. Consultado en septiembre de 2015, en [http://ec.europa.eu/health/antimicrobial\\_resistance/docs/2015\\_amr\\_progress\\_report\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/docs/2015_amr_progress_report_en.pdf)
- European Commission. (2017). A European One Health Action Plan Against Antimicrobial Resistance (AMR). Consultado en Marzo de 2017, en [http://ec.europa.eu/dgs/health\\_food-safety/amr/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/amr/index_en.htm)
- European Commission. (2007). Commission Regulation 1237/2007 of 23 October 2007 amending Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council and Decision 2006/696/EC as regards the placing on the market of eggs from Salmonella infected flocks of laying hens.
- European Commission. (2008). Commission Regulation (EC) No 589/2008. Laying down detailed rules for implementing Council Regulations (EC) No 1234/2007 as regards marketing standards for eggs.
- European Medicine Agency. (2009). Reflection paper on the use of 3rd and 4th generation cephalosporins in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32, 515-533.
- European Parliament and Council of the European Union. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance. Consultado en noviembre de 2015, en <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN>
- Evans, J. K., Buchanan, K. L., Griffith, S. C., Klasing, K. C., & Addison, B. (2017). Ecoimmunology and microbial ecology: Contributions to avian behavior, physiology, and life history. *Hormones and Behavior*, 88, 112-121.
- Evans, M. R., Lance, W., & Ribeiro, C. D. (1998). Salmonella Enteritidis PT6: another egg-associated salmonellosis? *Emerging Infectious Diseases*, 4, 667-669.
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, 2(1), 40-61. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x
- FAO. (2010). Agribusiness handbook Poultry Meat & Eggs. Consultado en septiembre de 2015, en [http://www.eastagri.org/publications/pub\\_docs/6\\_Poultry\\_web.pdf](http://www.eastagri.org/publications/pub_docs/6_Poultry_web.pdf)
- Fernández, L., McPhee, J. B., Tamber, S., Brazas, M. D., Lewenza, S., & Hancock, R. E. (2017). Antibiotic resistance due to reduced uptake. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette,

- K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial drug resistance. Mechanisms of drug resistance, volume 1* (pp. 115-130). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4
- Flock, D. K., & Preisinger, R. (2007). Specialization and concentration as contributing factors to the success of the poultry industry in the global food market. *Archiv für Geflügelkunde*, 5, 193-199.
- Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus spp.* isolated from U.S. food animals. *Frontiers in Microbiology*, 4, 135. doi:10.3389/fmicb.2013.00135
- Furtula, V., Farrell, E., Diarrassouba, F., Rempel, H., Pritchard, J., & Diarra, M. (2010). Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. *Poultry Science*, 89, 180-188.
- Gast, R. K., Guraya, R., Jones, D. R., & Anderson, K. E. (2014). Contamination of eggs by *Salmonella enterica* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. *Poultry Science*, 93, 728-733.
- Giovanardi, D., Campagnari, E., Ruffoni, L., Pesente, P., Ortali, G., & Furlattini, V. (2005). Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathology*, 34, 313-318.
- Grande Burgos, M. J., Fernández Márquez, M. L., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas López, R. (2016). Virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from hen egg shells. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 89-95.
- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), a025387. doi:10.1101/cshperspect.a025387
- Hanson, N., Thomson, K. S., Moland, E. S., Sanders, C. C., Berthold, G., & Penn, R. G. (1999). Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 337-380.
- Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H. I., Huang, L., . . . Yuan, Z. (2014). Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in Microbiology*, 5, 288. doi:10.3389/fmicb.2014.00288
- Harisberger, M., Gobeli, S., Hoop, R., Dewulf, J., Perreten, V., & Regula, G. (2011). Antimicrobial resistance in swiss laying hens, revalence and risk factors. *Zoonoses and Public Health*, 58, 377-387.
- Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 236-243.
- Hidano, A., Yamamoto, T., Hayama, Y., Muroga, N., Kobayashi, S., Nishida, T., & Tsutsui, T. (2015). Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among

- Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS ONE*, 10(3). doi:10.1371/journal.pone.0121189
- Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., & Asai, T. (2013). Diversity of plasmid replicons encoding the bla<sub>CMY-2</sub> gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(3), 243-249. doi:10.1089/fpd.2012.1306
- Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421-569. doi:10.4161/viru.21282
- Hong, P. Y., Al-Jassim, N., Ansari, M. I., & Mackie, R. I. (2013). Environmental and public health implications of water reuse: Antibiotics, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Antibiotics*, 2, 367–399. doi:10.3390/antibiotics2030367
- Hooper, D. C. (2003). In D. C. Hooper, & E. Rubinstein (Eds.), *Quinolone Antimicrobial Agents 3rd edition* (pp. 41-67). Washington, USA: ASM Press.
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 12-31. doi:0.1111/nyas.12830
- Hricová, K., Röderová, M., Pudová, V., Hanulík, V., Halová, D., Julínková, P., . . . Bardoň, J. (2017). Quinolone-Resistant *Escherichia coli* in poultry farming. *Central European Journal of Public Health*, 25, 163-167.
- Huijbers, P. M., Graat, E. A., van Hoek, A. H., Veenman, C., de Jong, M. C., & van Duijkeren, E. (2016). Transmission dynamics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in a broiler flock without antibiotic use. *Preventive Veterinary Medicine*, 131, 12-19. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.07.001
- Humphrey, T. J. (1994). Contamination of egg shell and contents with *Salmonella Enteritidis*: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 31-40.
- Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. *Food Research International*, 45, 819–830.
- Huys, G., D'Haene, K., Collard, J. M., & Swings, J. (2004). Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1555-1562.
- Jacoby, G. A. (1997). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino- $\beta$ -lactams. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11(4), 875-887.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 161-182. doi:10.1128/CMR.00036-08
- Jacoby, G. A. (2017). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial Drug Resistance. Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1* (2nd ed., pp. 265-268). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4

- Jacoby, G. A. (2018). Transmissible antibiotic resistance. In I. w. Fong, D. Shlaes, & K. Drlica (Eds.), *Antimicrobial resistance in the 21st century* (2nd ed., pp. 341-382). Springer. doi:10.1007/978-3-319-78538-7
- Jacoby, G. A., & Bush, K. (2005).  $\beta$ -Lactam resistance in the 21st century. Pages 53-65 in *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. In D. White, M. Alekshum, & P. McDermott (Ed.), *Frontiers in Antimicrobial Resistance* (pp. 53-65). Washington DC: ASM Press.
- Jiménez-Belenguer, A., Doménech, E., Villagrà, A., Fenollar, A., & Ferrús, M. A. (2016). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. *Avian Pathology*, 45(4), 501-507. doi:10.1080/03079457.2016.1168515
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Francisco, A. P., Martins, A. P., Domingues, G., Louro, D., . . . Canic, a, M. (2013). Assessing the molecular basis of transferable quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* from food-producing animals and food products. *Veterinary Microbiology*, 167, 523-531.
- Kampranis, S., & Maxwell, A. (1998). The DNA gyrase-quinolone complex, ATP hydrolysis, and the mechanism of DNA cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, 173, 22615-22626. doi: 10.1074/jbc.273.35.22615
- Kaspersen, H., Urdahl, A. M., Simm, R., Slette-meås, J. S., Lagesen, K., & Norström, M. (2018). Occurrence of quinolone resistant *E. coli* originating from different animal species in Norway. *Veterinary Microbiology*, 217, 25-31.
- Kaukas, A., Hinton, M., & Linton, A. H. (1987). The effect of ampicillin and tylosin on the faecal enterococci of healthy young chickens. *Journal of Applied Bacteriology*, 62(5), 441-447.
- Kim, Y. B., Seo, K. W., Jeon, H. Y., Lim, S. K., Sung, H. W., & Lee, Y. J. (2018). Molecular characterization of erythromycin and tetracycline-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken meats. *Poultry Science*, 0, 1-7. doi:10.3382/ps/pey477
- Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 559-566.
- Lanz, R., Kuhnert, P., & Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 91(1), 73-84.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., & Rösler, U. (2014). Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Veterinary Microbiology*, 172, 519-527.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Käsbohrer, A., Kreienbrock, L., & Roesler, U. (2013). Longitudinal monitoring of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase/AmpC-

- producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*, 4815-4820.
- Lautenbach, E., Strom, B. L., Bilker, W. B., Patel, J. B., Edelstein, P. H., & Fishman, N. O. (2001). Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases*, *33*, 1288-1294.
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., . . . Mevius, D. J. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*, 873-880. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x
- Li, X. Z. (2017). Active efflux as a mechanism of resistance to antimicrobial drugs. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial drug resistance. Mechanisms of drug resistance, Volume 1* (pp. 131-148). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4
- Li, X. Z., Ma, D., Livermore, D. M., & Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to  $\beta$ -lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*, 1742-1752. doi:10.1128/aac.38.8.1742
- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: neglected yet ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1374. doi:10.3389/fmicb.2016.01374
- Losasso, C., Di Cesare, A., Mastrorilli, E., Patuzzi, I., Cibir, V., Eckert, E. M., . . . Corno, G. (2018). Assessing antimicrobial resistance gene load in vegan, vegetarian and omnivore human gut microbiota. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *52*(5), 702-705. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.07.023
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J., & Lee, M. D. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*, 6816-6824.
- Maasjost, J., Mühldorfer, K., Cortez de Jäckel, S., & Hafez, H. M. (2015). Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from poultry flocks in Germany. *Avian Diseases*, *59*, 143-148.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*, 268-281.
- Manageiro, V., Clemente, L., Graça, R., Correia, I., Albuquerque, T., Ferreira, E., & Caniça, M. (2017). New insights into resistance to colistin and third-generation cephalosporins of

- Escherichia coli* in poultry, Portugal: Novel blaCTX-M-166 and blaESAC genes. *International Journal of Food Microbiology*, 263, 67-73.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. *Molecules*, 23(4), 795. doi:10.3390/molecules23040795
- Marosevic, D., Cervinkova, D., Vlkova, H., Videnska, P., Babak, V., & Jaglic, Z. (2014). In vivo spread of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) resistance-A model study in chickens. *Veterinary Microbiology*, 171, 388-396.
- Martínez, J. L., Coque, T. M., & Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 116-123.
- Martins da Costa, P. 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.
- Mawer, S. L., Spain, G. E., & Rowe, B. (1989). *S. enteritidis* phage type 4 and hens eggs. *Lancet*, 333, 280-281.
- McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 93–106.
- Merchant, L. E., Rempel, H., Forge, T., Kannangara, T., Bittman, S., Delaquis, P., . . . Diarra, M. S. (2012). Characterization of antibiotic-resistant and potentially pathogenic *Escherichia coli* from soil fertilized with litter of broiler chickens fed antimicrobial-supplemented diets. *Canadian Journal of Microbiology*, 58, 1084-1098.
- Miller, C., Thomsen, L., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. (2004). SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305, 1629-1631.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2018). *Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas*. Madrid: Secretaría general técnica. Centro de publicaciones.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018). *Avicultura de carne*. Consultado el 17 de octubre de 2019, en <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/aves-carne.aspx>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019a). *Avícola de carne*. Consultado el 16 de octubre de 2019, en <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/avicola-de-carne/>

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019b). *Informe del consumo alimentario en España 2018*. Madrid. Consultado el 3 de septiembre de 2019, en <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/>
- Miranda, J. M., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2008, august). Evolution of Resistance in Poultry Intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poultry Science*, *87*(8), 1643-1648. doi: /10.3382/ps.2007-00485
- Mo, S. S., Kristoffersen, A. B., Sunde, M., Nødtvedt, A., & Norström, M. (2016). Risk factors for occurrence of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Norwegian broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, *130*, 112-118.
- Moreno, M. A., García-Soto, S., Hernández, M., Bárcena, C., Rodríguez-Lázaro, D., Ugarte-Ruíz, M., & Domínguez, L. (2019). Day-old chicks are a source of antimicrobial resistant bacteria for laying hen farms. *Veterinary Microbiology*, *230*, 221-227.
- Musgrove, M. T., Jones, D. R., Northcutt, J. K., Cox, N. A., Harrison, M. A., Fedorka-Cray, P. J., & Ladely, S. R. (2006). Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. *Poultry Science*, *85*, 1665-1669.
- Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, *15*, 209-215.
- Nilsson, O., Börjesson, S., Landén, A., & Bengtsson, B. (2014). Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*, 1497-1500.
- Nordstrom, K. (2005). Plasmid R1—replication and its control. *Plasmid*, *55*, 1-26.
- Nowakiewicz, A., Ziolkowska, G., Troscianczyk, A., Zieba, P., & Gnat, S. (2017). Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. *Poultry Science*, *96*, 986-996.
- Page, M. G. (2008). Extended-spectrum b-lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*, 63-74. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01863.x
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, *16*, 964. doi:10.1186/s12864-015-2153-5
- Palzkill, T. (2018). Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC  $\beta$ -lactamases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *5*, 16. doi:10.3389/fmolb.2018.00016
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2003). Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en

- la alimentación animal (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial de la Unión Europea.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2018, mayo 30). Reglamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) n.o 834/2007 del Consejo.
- Paterson, D. L., Mulazimoglu, L., Casellas, J. M., Ko, W. C., Goossens, H., Von Gottberg, A., . . . Yu, V. L. (2000). Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, *30*, 473-478.
- Perales, I., & Audicana, A. (1989). The role of hens' eggs in outbreak of salmonellosis in North Spain. *International Journal of Food Microbiology*, *8*, 175-180.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., & Ellerbroek, L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, *88*, 311-314.
- Petersen, A., Christensen, J., Kuhnert, P., Bisgaard, M., & Olsen, J. (2006). Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. *Veterinary Microbiology*, *116*, 120-128.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., . . . Waddell, J. (2004, January). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(1), 28-52.
- Pioletti, M., Schlünzen, F., Harms, J., Zarivach, R., Glühmann, M., Avila, H., . . . Franceschi, F. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal*, *20*(8), 1829-1839. doi:10.1093/emboj/20.8.1829
- Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos. (2018). Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. Madrid. Consultado el 2 de agosto de 2019, en <http://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-jiacra-espana>
- Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*(1), 12-26. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x
- Pouwels, K. B., Muller-Pebody, B., Smieszek, T., Hopkins, S., & Robotham, J. V. (2019). Selection and co-selection of antibiotic resistances among *Escherichia coli* by antibiotic use in primary care: An ecological analysis. *PLoS One*, *14*(6), e0218134. doi:10.1371/journal.pone.0218134
- Projahn, M., Daehre, K., Roesler, U., & Friese, A. (2017). Extended-spectrum-beta-lactamase and plasmid-encoded cephamycinase-producing enterobacteria in the broiler hatchery

- as a potential mode of pseudo-vertical transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*, e02364-16.
- Radhouani, H., Igrejas, G., Pinto, L., Gonçalves, A., Coelho, C., Rodrigues, J., & Poeta, P. (2011). Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls (*Larus cachinnans*) representing an environmental health problem. *Journal of Environmental Monitoring*, *13*, 2227-2233.
- Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, *141*, 3015-3027.
- Rice, L. B. (1999). Successful interventions for gram-negative resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics. *Pharmacotherapy*, *19*(8 Pt 2), 120S-128S. doi:10.1592/phco.19.12.120s.31699
- Roberts, C. M. (s.f.). *Tetracycline and MLS Nomenclature*. Consultado el 12 de octubre de 2019, en <http://faculty.washington.edu/marilynr/>
- Roberts, M. C. (2011). Mechanisms of bacterial antibiotic resistance and lessons learned from environmental tetracycline-resistant bacteria. In P. L. Keen, & M. H. Montforts (Eds.), *Antimicrobial Resistance in the Environment*. Hoboken, New Jersey: Wiley.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet. Infectious Diseases*, *40*, 629-640.
- Roy, P. H., & Partridge, S. R. (2017). Genetic mechanisms of transfer of drug resistance. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial drug resistance. Mechanisms of drug resistance, Volume 1* (2nd ed., pp. 61-76). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *18*, 353-358.
- SANCO. (2016). Programa nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*. España.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*, 234-258. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x
- 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
- Schwaiger, K., Harms, K., Holzel, C., Meyer, K., Karl, M., & Bauer, J. (2009). Tetracycline in liquid manure selects for co-occurrence of the resistance genes *tet(M)* and *tet(L)* in *Enterococcus faecalis*. *Veterinary Microbiology*, *139*, 386-392. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.005

- Seo, K. W., Shim, J. B., & Lee, Y. J. (2019). Emergence of CMY-2-producing *Escherichia coli* in Korean layer parent stock. *Microbial Drug Resistance*, 25, ahead of print.
- Shivaprasad, H. L. (2000). Fowl typhoid and pullorium disease. *Revue Scientifique et Technique*, 19, 405-424.
- Smith, J. L., Drum, D. J., Dai, Y., Kim, J. M., Sanchez, S., Maurer, J. J., . . . D., L. M. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1404-1414.
- Snow, L. C., Davies, R. H., Christiansen, K. H., Carrique-Mas, J. J., Wales, A., & O'Connor, J. L. (2007). Survey of *Salmonella* prevalence in Laying flocks in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 161, 471-476.
- Statens Serum Institut. (s.f.). DANMAP. Consultado el 20 de octubre de 2019, desde <https://www.danmap.org/>
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 664-89. doi:10.1128/CMR.00016-09
- Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2019). *El sector de la avicultura de carne en cifras: Principales indicadores económicos*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2016). *Caracterización del sector avícola de puesta en España*. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.
- Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2019). *El sector de la avicultura de puesta en cifras: principales indicadores económicos*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Suresh, T., Hatha, A. A., Sreenivasan, D., Sangeetha, N., & Lashmanaperumalsamy, P. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retail markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 23, 294-299.
- Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1842-1852. doi:10.1093/jac/dkq217
- Tamura, N., Konishi, S., & Yamaguchi, A. (2003). Mechanisms of drug/H<sup>+</sup> antiport: complete cysteine-scanning mutagenesis and the protein engineering approach. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 570-579. doi:10.1016/j.cbpa.2003.08.014
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., . . . Ghali, W. A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its

- associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, 1(8), e316-e327. doi:10.1016/S2542-5196(17)30141-9
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., & Wright, G. D. (2010). The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 419-431. doi:10.1007/s00018-009-0172-6
- Thayer, S. G., & Waltman, W. D. (2013). Enterococcus. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, & V. Nair (Eds.), *Diseases of poultry* (13th ed., pp. 1033-1035). New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Tian, G. B., Wang, H. N., Zhang, A. Y., Zhang, Y., Fan, W. Q., Xu, C. W., . . . Zou, L. K. (2012). Detection of clinically important  $\beta$ -lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 233-238. doi:10.1099/jmm.0.036806-0
- Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54, 1133-1141. doi:10.1073/pnas.54.4.1133
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472-3500. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., del Campo, R., & Coque, T. M. (2018). Antimicrobial resistance in *Enterococcus spp.* of animal origin. *Microbiology Spectrum*, 6(4), ARBA-0032-2018. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018
- Trampel, D. W., Holder, T. G., & Gast, R. K. (2014). Integrated farm management to prevent *Salmonella Enteritidis* contamination of eggs. *The Journal of Applied Poultry Research*, 23(2), 353-365. doi:10.3382/japr.2014-00944
- Tremblay, C. L., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., Daignault, D., & Archambault, M. (2011). Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of *tetO* and *ermB* genes. *Journal of Food Protection*, 74, 1639-1648.
- Tyson, G. H., Nyirabahizi, E., Creary, E., Kabera, C., Lam, C., Rice-Trujillo, C., . . . Tate, H. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, pii: e01902-17. doi:10.1128/AEM.01902-17
- Utrarachkij, F., Pornraungwong, S., Siripanichgon, K., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Suthienkul, O. (2012). Possible horizontal transmission of *Salmonella* via reusable egg trays in Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 73-78.
- Valdivia, L., & Rice, L. B. (2017). Target-mediated antibacterial resistance. In D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, & D. Marchaim (Eds.), *Antimicrobial drug resistance*.

- Mechanisms of drug resistance, Volume 1* (pp. 89-96). Springer. doi:10.1007/978-3-319-46718-4
- Van den Bogaard, A., London, N., Driessen, C., & Stobberingh, E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *47*, 763-771.
- Vangchhia, B., Blyton, M. D., Collignon, P., Kennedy, K., & Gordon, D. M. (2017). Factors affecting the presence, genetic diversity and antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* in poultry meat samples collected from Canberra, Australia. *Environmental Microbiology*, *20*(4), 1350-1361. doi:10.1111/1462-2920.14030
- Voetsch, A. C., Van Gilder, T. J., Angulo, F. J., Farley, M. M., Shallow, S., Marcus, R., . . . Group, E. I. (2004). FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(Supplement 3), S127-S134.
- Warsa, U. C., Nonoyama, M., Ida, T., Okamoto, R., Okubo, T., Shimauchi, C., . . . Inoue, M. (1996). Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the polymerase chain reaction. *Journal of Antibiotics*, *49*, 1127-1132.
- Watson, R. (2008). Multidrug resistance responsible for half of deaths from healthcare associated infections in Europe. *British Medical Journal*, *336*, 1266-1267. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.39601.623808.4E>
- Weisblum, B. (1995). Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(4), 797-805.
- WHO. (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. World Health Organizations.
- WHO. (2019). Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva.
- WHO Advisory Group on Integrated Surveillance . (2013). *Critically important antimicrobials for human medicine. 4th revision*. World Health Organization. Consultado en septiembre de 2015, en [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf)
- Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*, 20140083. doi:10.1098/rstb.2014.0083
- You , Y., & Silbergeld , E. K. (2014). Learning from agriculture: Understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 284. doi:You Y, Silbergeld EK. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Front Microbiol*. 2014;5:284. Published 2014 Jun 10. doi:10.3389/fmicb.2014.00284

- Zimmermann, W., & Rosselet, A. (1977). Function of outer membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12, 368-372. doi:10.1128/aac.12.3.368
- Zurfluh, K., Wang, J., Klumpp, J., Nuesch-Inderbinen, M., Fanning, S., & Stephan, R. (2014). Vertical transmission of highly similar bla *CTX-M-1*-harboring *Incl1* plasmids in escherichia coli with different MLST types in the poultry production pyramid. *Frontiers in Microbiology*, 5, 519.

## Anexos

### Anexo I. Abreviaturas usadas

Agar PC: Plate Count agar

Agar TBX: Tryptone Bile X-glucuronide agar

Agar TSI: Triple Sugar Iron agar

Agar XLD: Xylose Lysine Deoxycholate agar

AK: amikacina

AMC: amoxicilina - ácido clavulánico

AMP: ampicilina

ANOVA: Análisis de la Varianza

APT: Agua de Peptona Tamponada

BHIA: Brain Heart Infusion agar

C: cloranfenicol

CAZ: ceftazidima

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CE: Comisión Europea

CIP: ciprofloxacino

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CN: gentamicina

CRO: ceftriaxona

CTX: cefotaxima

D: dosis de antibiótico administrada

D1: dosis de 24 mg de amoxicilina/kg de animal

D2: dosis de 12 mg de amoxicilina/Kg de animal

D3: 8 mg de amoxicilina/Kg de animal

E: eritromicina

EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA: European Food Safety Authority

ESBL:  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases en inglés)

I: susceptibilidad intermedia al antibiótico

K: kanamicina

KAA agar: Kanamicina esculina azida agar

KF: cefalotina

LSD: Diferencia mínima significativa de Fisher (Fisher's Least Significant Difference en inglés)

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MCA: Análisis de Correspondencia Múltiple (Multiple Correspondence Analysis en inglés)

MFS: Major Facilitator Superfamily

MKTTn: caldo Müller-Kauffmann Tetrionato con novobiocina

MLS: Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B (Macrolides, Lincosamides and Streptogramins B en inglés)

mPCR: multiplex Polymerase Chain Reaction

MR: multirresistentes (cepas resistentes a 3 o más antibióticos de distinta clase)

NA: ácido nalidíxico

PBP: Proteínas fijadoras de Penicilina (Penicillin-Binding Proteins en inglés)

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMQR: Resistencia a Quinolonas Transmitida por Plásmidos (Plasmid-Mediated Quinolone Resistance en inglés)

QD: quinopristin/Dalfopristin

R: resistente al antibiótico

RPPs: Proteínas de Protección Ribosomal a la Tetraciclina (Ribosomal Protection Proteins en inglés)

RV: caldo Rappaport-Vassiliadis

S: estreptomicina

SB agar: Slanetz-Bartley agar

Sn: sensible al antibiótico

T: tratamiento que se administró a las aves durante 3 días

T1: primer tratamiento antibiótico con amoxicilina

T2: segundo tratamiento antibiótico con amoxicilina

T3: tercer tratamiento antibiótico con amoxicilina

TE: tetraciclina

UE: Unión Europea

VA: vancomicina