

# Effect of farm management on antimicrobial resistance and intestinal microbiota in poultry production

## RESUMEN EN CASTELLANO

---

La concienciación social con respecto al bienestar animal, la seguridad alimentaria, las resistencias antimicrobianas y la salud medioambiental ha incrementado en los últimos años, creando un nuevo reto para los productores avícolas y promoviendo la implementación de sistemas de producción alternativos que incluyan el concepto 'One Health' ("una sola salud") en su diseño. Por ello, la producción avícola se encuentra en constante desarrollo para conseguir satisfacer las demandas de los consumidores. Por ello, se han propuesto diferentes alternativas para ser aplicadas a nivel de campo, centradas en la mejora de los protocolos de bioseguridad, el uso de estirpes más rústicas y de crecimiento lento, así como la implementación de la ganadería de precisión. Se ha demostrado que una inversión en sistemas de manejo más precisos y respetuosos con el bienestar animal puede tener un efecto directo sobre la salud de los mismos, aumentando su resiliencia, y consiguiendo pollos con un sistema inmunitario reforzado, más capaces de superar los retos ambientales o las enfermedades infecciosas.

En este contexto, el desarrollo y la composición de la microbiota tienen un papel importante en la salud de los animales, en los índices productivos conseguidos, en la diseminación de resistencias antimicrobianas y en la transmisión de patógenos zoonóticos a lo largo de la cadena alimentaria. Una mejora del bienestar animal no solo incrementa la resiliencia de los animales, sino que también se ha demostrado que promueve la presencia de microbiota intestinal beneficiosa y la integridad del epitelio intestinal. Como consecuencia, los mecanismos de protección funcionan perfectamente y las interacciones entre las bacterias ambientales y las intestinales se reducen. De esta manera, sería posible conseguir una reducción de la administración de antibióticos a nivel de campo, muy necesaria debido a la estrecha relación entre el empleo de antibióticos en producción animal y la aparición de resistencias en humanos, demostrada por diferentes estudios. Además, también se podría reducir la presencia de patógenos zoonóticos, como *Salmonella*, en la cadena alimentaria. *Salmonella* spp. es la principal causa de brotes alimentarios en la Unión Europea, con un total de 91 857 casos de salmonelosis y 1 581

brotos notificados en 2018. La principal fuente de infección son los productos avícolas como huevos y carne de pollo, y los principales serotipos relacionados con estos brotes son *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* monofásica y *S. Infantis*, que actualmente es el serotipo más prevalente en pollos de engorde.

Por todo ello, el objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar el efecto de sistemas alternativos de producción avícola sobre el desarrollo y la composición de la microbiota, la evolución de las resistencias antimicrobianas y la epidemiología de *Salmonella*. Para ello, se realizaron dos experimentos diferentes.

En el **primer experimento**, se estudió el efecto de la estirpe genética, comparando una estirpe comercial de crecimiento rápido frente a una estirpe alternativa de crecimiento lento, producidas bajo sus respectivos sistemas de manejo. Los objetivos de este experimento fueron caracterizar la microbiota cecal e investigar la dinámica de las resistencias y multiresistencias antimicrobianas a lo largo del ciclo productivo. Para ello, se utilizaron dos estirpes comerciales de pollo de engorde, una de crecimiento rápido (Ross®) y otra de crecimiento lento (Hubbard®), y se alojaron 576 pollos en dos naves idénticas (288 animales en cada nave: 144 de crecimiento rápido y 144 de crecimiento lento). Se muestrearon animales de cada grupo experimental el día de la llegada, a mitad de ciclo (21 días de edad) y al final del ciclo (42 y 63 días de edad para las estirpes de crecimiento rápido y lento, respectivamente), y se tomaron muestras de ciego.

Para evaluar la composición de la microbiota, se realizó un análisis de secuenciación del ARNr 16S del contenido cecal. Los resultados mostraron que *Firmicutes* representó el filo dominante para ambos grupos. Al principio del ciclo, *Proteobacteria* fue el segundo filo más predominante para ambas estirpes, superando en número a *Bacteroidetes*. Sin embargo, durante el resto del ciclo productivo, *Bacteroidetes* fue más abundante que *Proteobacteria* en ambos grupos. Finalmente, independientemente del sistema de manejo, los géneros identificados más predominantes fueron *Oscillospira* spp., *Ruminococcus* spp., *Coprococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bacteroides* spp.

Para estudiar la evolución de las resistencias antimicrobianas, se seleccionó *Escherichia coli* como bacteria centinela y se evaluó la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos de acuerdo con la Decisión 652/2013. Al inicio del ciclo, se observaron diferencias significativas entre las estirpes, ya que las cepas de *E. coli* aisladas de pollitos de un día

de la estirpe de crecimiento rápido presentaron un mayor porcentaje de resistencia antimicrobiana. Sin embargo, al final del periodo de engorde, no se encontraron diferencias significativas entre las estirpes y la presencia de bacterias resistentes (por encima del 95% en ambos grupos). Por lo tanto, aunque no se administraron antibióticos durante el periodo de crecimiento, se observó un alto nivel de resistencia y multiresistencia antimicrobiana el día del sacrificio.

Los resultados de este experimento ponen de manifiesto que la microbiota de los pollos de engorde de las estirpes de crecimiento rápido y crecimiento lento está en constante desarrollo a lo largo del periodo de engorde, siendo relativamente estable desde los 21 días de edad. En cuanto la composición de la misma, a nivel de género cabe destacar que los tres grupos más abundantes para ambas estirpes, *Ruminococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bacteroides* spp., están relacionados con un mejor rendimiento productivo y salud intestinal. Además, los elevados niveles de resistencia y multiresistencia antimicrobiana presentes durante el ciclo productivo demuestran que, aunque es crucial controlar tanto el uso de antibióticos como el bienestar de los animales durante el periodo de engorde, deben tomarse medidas en todos los niveles de la cadena de producción.

En el **segundo experimento**, se evaluó el efecto de las condiciones de manejo de la granja, comparando las condiciones comerciales europeas de densidad y ventilación, frente a condiciones mejoradas. Los objetivos fueron caracterizar la microbiota cecal, evaluar la evolución de las resistencias y multiresistencias antimicrobianas, e investigar el desarrollo de *S. Infantis* y sus resistencias antimicrobianas a lo largo del periodo de engorde. Para ello, se alojaron 1062 pollitos de un día de una estirpe comercial de crecimiento rápido (Ross®), en dos naves avícolas bajo condiciones comerciales (33 kg/m<sup>2</sup> de densidad y un máximo de 20 ppm de amoníaco) y óptimas (17 kg/m<sup>2</sup> de densidad y un máximo de 10 ppm de amoníaco). Dentro de cada una de las naves, 234 animales se ubicaron en corralinas y 327 se alojaron directamente en la cama para simular el ambiente real de producción. Además, a las 24 horas de la llegada de los animales, el 20% de los mismos fueron infectados por vía oral con una cepa de *S. Infantis* susceptible a todos los antibióticos testados. También se muestrearon animales de cada grupo experimental el día de la llegada, a mitad del ciclo (21 días de edad) y al final del periodo de engorde (42 días de edad), y se tomaron muestras de ciego.

Para investigar la composición de la microbiota, se realizó un análisis de secuenciación del ARNr 16S. Los resultados mostraron un mayor nivel de diversidad en el grupo producido bajo condiciones de manejo óptimas. En cuanto a la composición de la microbiota, *Firmicutes* fue el filo dominante durante todo el ciclo productivo. Sin embargo, el segundo filo predominante el día de llegada fue *Proteobacteria*, y desde la mitad del periodo fue *Bacteroidetes*, en ambos grupos. Además, los géneros identificados más predominantes fueron *Oscillospira* spp., *Ruminococcus* spp., *Bacteroides* spp. y *Coprococcus* spp.

Para evaluar la dinámica de las resistencias antimicrobianas, al igual que en el primer experimento, se seleccionó *E. coli* como bacteria centinela y se evaluó la susceptibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos de acuerdo con la Decisión 652/2013. Los resultados mostraron altas tasas de resistencia antimicrobiana a lo largo del periodo de engorde, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Además, ambos grupos presentaron altas tasas de multirresistencia el día de sacrificio.

Por último, para estudiar la excreción de *Salmonella*, se tomaron muestras de heces de cada grupo experimental de manera semanal y se analizaron según la norma ISO 6579-2:2017. También se evaluó la susceptibilidad a los antibióticos según la Decisión 652/2013. Los recuentos más bajos de excreción de *Salmonella* se observaron en la primera semana post-infección y los más altos en el día de sacrificio, en ambos grupos. Además, el 100% de las cepas aisladas fueron multirresistentes después de la primera semana post-infección.

Estos resultados también revelan que la diversidad de la microbiota aumenta a lo largo del periodo de engorde, siendo relativamente estable desde mitad de ciclo. Sin embargo, al final del periodo, el nivel de diversidad de la microbiota es significativamente mayor en los animales producidos bajo condiciones óptimas de manejo en granja, pero sin diferencias estadísticas en su composición. Además, las resistencias y multirresistencias antimicrobianas están presentes a lo largo de todo el ciclo productivo, sin diferencias al final del mismo. En cuanto a la adquisición de resistencias antimicrobianas por parte de *S. Infantis*, se inicia al principio del ciclo de producción y se mantiene hasta el final, lo que demuestra la importancia de la transmisión de resistencias a las bacterias zoonóticas en las explotaciones avícolas.

En conclusión, los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral incluyen que la diversidad y la composición de la microbiota están en constante desarrollo a lo largo del periodo de engorde, viéndose afectadas por los factores de manejo estudiados. Además, las resistencias antimicrobianas están presentes en las bacterias comensales desde el día de llegada, y aumenta hasta el final del ciclo, destacando la necesidad de controlar la administración de antibióticos en todas las etapas de la producción avícola. En cuanto a la epidemiología de *S. Infantis*, la continua excreción durante todo el periodo de engorde y su capacidad de adquirir resistencias, independientemente de las condiciones de manejo en granja, sugieren la necesidad de realizar más estudios para poder establecer mejores programas de control de la bacteria a lo largo de la cadena alimentaria.