



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio de la presencia de genes de resistencia a
antibióticos en bacterias aisladas de carnes
comercializadas en Valencia.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Ancos Jimeno, Carmen de

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a: Montes Estellés, Rosa M^a

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

8



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural

AISLAMIENTO DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS
Y ESTUDIO DE LOS GENES DE RESISTENCIA PRESENTES EN CARNE
COMERCIALIZADAS EN VALENCIA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Alumna: Carmen de Ancos Jimeno

Tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Co-tutora: Rosa María Montes Estellés

Valencia, Julio 2023

Aislamiento de bacterias resistentes a antibióticos betalactámicos y estudio de los genes de resistencia presentes en carnes comercializadas en Valencia

Resumen

El uso de los antibióticos se ha incrementado considerablemente a lo largo de los años, tanto en su utilización en humanos como en animales. Este aumento en su uso está relacionado con la aparición de bacterias resistentes a estos, suponiendo un gran problema para la salud pública y la seguridad alimentaria. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la resistencia a los antimicrobianos como una de las 10 principales amenazas sanitarias globales.

La presencia de genes de resistencia en bacterias patógenas o indicadoras pueden hacer que estos se diseminen entre bacterias del huésped mediante transferencia horizontal aumentando el riesgo de infecciones por bacterias multirresistentes. Por esta razón, la presencia de este tipo de bacterias en alimentos como la carne puede acarrear un gran problema al consumidor.

En este trabajo final de grado se analizaron 30 muestras de carnes de cerdo (14 muestras) y pollo (16 muestras) comercializadas en la ciudad de Valencia con tal de determinar su papel en la transmisión de bacterias resistentes y sus genes.

En primer lugar, se aislaron cepas mediante el uso de medios no selectivos de resistencia, aislando coliformes, *Escherichia coli* y sospechosos de género *Salmonella*. A su vez, se aislaron bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos y a cefalosporinas de tercera generación mediante el uso de medios suplementados con estos antibióticos. Estos aislados fueron filtrados mediante el uso de pruebas previas bioquímicas para obtener aquellos con las características deseadas: Oxidasa negativa, Catalasa positiva y Tinción de Gram negativa. Después se realizó la identificación bioquímica y por secuenciación 16S del ARN ribosómico si el porcentaje de identificación era por debajo del 90%. Un total de 79 cepas fueron aisladas.

Para finalizar, se estudió para presencia de genes de resistencia a β -lactámicos (*bla*_{TEM}; *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY2}), genes de resistencia a carbapenemes (*bla*_{OXA}; *bla*_{KPC}; *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}) y genes de resistencia frente a quinolonas (*Qnr A*; *Qnr B* y *Qnr S*). Un 75,95% de las cepas aisladas presenta al menos un gen de resistencia y un 39,24% presentan más de una familia de genes. Solo 3 cepas presentan genes de todas las familias analizadas.

Destacan principalmente cepas presentes en la lista de patógenos críticos de OMS debido a su resistencia a antibióticos carbapenémicos y β -Lactámicos como *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*.

Este trabajo final de grado está relacionado principalmente con los siguientes objetivos de desarrollo sostenible: ODS 2 Hambre cero; ODS 3 Salud y bienestar; ODS 1 Fin de la pobreza; ODS 12 Producción y consumo responsables y ODS 8 Trabajo decente y crecimiento.

Palabras clave: resistencia antibióticos; genes de resistencia; betalactámicos; carbapenemes; quinolonas; carnes; PCR; *Salmonella*; *E. coli*; *Acinetobacter baumannii*

Alumna: Carmen de Ancos Jimeno

Tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Co-tutora: Rosa María Montes Estellés

Valencia, Julio 2023

Aïllament de bacteris resistents a antibiòtics betalactàmicos i estudi dels gens de resistència presents en carns comercialitzades a València

Resum

L'ús dels antibiòtics s'ha incrementat considerablement al llarg dels anys, tant en la seua utilització en humans com en animals. Aquest augment en el seu ús està relacionat amb l'aparició de bacteris resistents a aquests, suposant un gran problema per a la salut pública i la seguretat alimentària. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) considera la resistència als antimicrobians com una de les 10 principals amenaces sanitàries globals.

La presència de gens de resistència en bacteris patògens o indicadors poden fer que aquests es disseminin entre bacteris de l'hoste mitjançant transferència horitzontal augmentant el risc d'infeccions per bacteris multiresistents. Per aquesta raó, la presència d'aquesta mena de bacteris en aliments com la carn pot implicar un gran problema al consumidor.

En aquest treball final de grau es van analitzar 30 mostres de carns de porc (14 mostres) i pollastre (16 mostres) comercialitzades a la ciutat de València amb la condició de determinar el seu paper en la transmissió de bacteris resistents i els seus gens.

En primer lloc, es van aïllar ceps mitjançant l'ús de mitjans no selectius de resistència, aïllant coliformes, *Escherichia coli* i sospitosos de gènere *Salmonella*. Al seu torn, es van aïllar bacteris resistents a antibiòtics carbapenémicos i a cefalosporinas de tercera generació mitjançant l'ús de mitjans suplementats amb això antibiòtics. Aquests aïllats van ser filtrats mitjançant l'ús de proves prèvies bioquímiques per a obtenir aquells amb les característiques desitjades: Oxidasa negativa, Catalasa positiva i Tinció de Gram negativa. Després es va realitzar la identificació bioquímica i per seqüenciació 16S de l'ARN ribosòmic si el percentatge d'identificació era per davall del 90%. Un total de 79 ceps van ser aïllades.

Per a finalitzar, es va estudiar per a presència de gens de resistència a β -lactàmicos (*bla_{TEM}*; *bla_{SHV}* i *bla_{CMY2}*), gens de resistència a carbapenemes (*bla_{OXA}*; *bla_{KPC}*; *bla_{IMP}* i *bla_{VIM}*) i gens de resistència enfront de quinolonas (*Qnr A*; *Qnr B* i *Qnr S*). Un 75,95% dels ceps aïllats presenta almenys un gen de resistència i un 39,24% presenten més d'una família de gens. Només 3 ceps presenten gens de totes les famílies analitzades.

Destaquen principalment ceps presents en la llista de patògens crítics d'OMS a causa de la seua resistència a antibiòtics carbapenémicos i β -Lactàmicos com *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*.

Aquest treball final de grau està relacionat principalment amb els següents objectius de desenvolupament sostenible: ODS 2 Fam zero; ODS 3 Salut i benestar; ODS 1 Fi de la pobresa; ODS 12 Producció i consum responsables i ODS 8 Treball decent i creixement.

Paraules clau: resistència antibiòtics; gens de resistència; betalactàmicos; carbapenemes; quinolonas; carns; PCR; *Salmonella*; *E. coli*; *Acinetobacter baumannii*

Isolation of bacteria resistant to beta-lactam antibiotics and study of resistance genes present in meats marketed in Valencia.

Abstract

The use of antibiotics has increased considerably over the years, both in humans and animals. This increase in their use is related to the emergence of antibiotic-resistant bacteria, which is a major problem for public health and food safety. The World Health Organization (WHO) considers antimicrobial resistance as one of the top 10 global health threats.

The presence of resistance genes in pathogenic or indicator bacteria can cause them to spread among host bacteria through horizontal transfer, increasing the risk of infections by multidrug-resistant bacteria. For this reason, the presence of this type of bacteria in foods such as meat can be a great problem for the consumer.

In this final degree work, 30 samples of pork (14 samples) and chicken (16 samples) commercialized in the city of Valencia were analyzed in order to determine their role in the transmission of resistant bacteria and their genes.

First, strains were isolated using non-selective resistance media, isolating coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* suspects. In turn, bacteria resistant to carbapenem antibiotics and third generation cephalosporins were isolated using media supplemented with these antibiotics. These isolates were filtered by using biochemical pretests to obtain those with the desired characteristics: Oxidase negative, Catalase positive and Gram stain negative. Biochemical identification and 16S ribosomal RNA sequencing were then performed if the identification rate was below 90%. A total of 79 strains were isolated.

Finally, we studied the presence of β -lactam resistance genes (*bla*_{TEM}; *bla*_{SHV} and *bla*_{CMY2}), carbapenem resistance genes (*bla*_{OXA}; *bla*_{KPC}; *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}) and quinolone resistance genes (*Qnr A*; *Qnr B* and *Qnr S*). A total of 75.95% of the isolated strains present at least one resistance gene and 39.24% present more than one gene family. Only 3 strains present genes from all the families analyzed.

Strains present in the WHO list of critical pathogens due to their resistance to carbapenem antibiotics and β -Lactams such as *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* stand out.

This final degree work is mainly related to the following sustainable development goals: SDG 2 Zero hunger; SDG 3 Health and well-being; SDG 1 End poverty; SDG 12 Responsible production and consumption and SDG 8 Decent work and growth.

Keywords: antibiotic resistance; resistance genes; beta-lactams; carbapenems; quinolones; meats; PCR; *Salmonella*; *E. coli*; *Acinetobacter baumannii*.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis tutoras, Ana y Rosa, por estar ahí ayudándome y guiándome a lo largo de este proyecto y por enseñarme a ser una mejor investigadora. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio que hacían que las largas horas se hicieran más amenas y siempre estaban allí para ayudar con cualquier cosa.

Sobre todo, agradecer a mis padres y mi hermana por aguantar incontables llamadas sobre temas de los que no entendían solo por hacerme feliz. Gracias por estar ahí siempre cuando lo necesitaba.

Índice de figuras

Figura 1. Consumo de carne de ave y cerdo desde el 2006 al 2021. A) Cantidad consumida total (miles de unidades) y B) Cantidad consumida media por persona. Fuente: Instituto Nacional de Estadística (INE).....	1
Figura 2. Resultados positivos y negativos de las Tiras API 20E. Fuente: APIWEB.....	14
Figura 3. Especies identificadas de las 79 cepas aisladas.....	18
Figura 4. Número de cepas aisladas por tipo de muestra de Cerdo	19
Figura 5. Número de cepas aisladas por tipo de muestra de pollo.....	19
Figura 6. Número de cepas aisladas en medio CC	20
Figura 7. Número de cepas aisladas en medios específicos de Salmonella.....	21
Figura 8. Gráfico de medias resultante del ANOVA simple realizado sobre el gen blaKPC.....	23
Figura 9. Gráfico de medias obtenido del ANOVA simple realizado sobre el gen Qnr B.....	24
Figura 10. Frecuencia de la detección de los genes estudiados	25

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de las muestras utilizadas para este estudio.	12
Tabla 2. Iniciadores utilizados en la detección de genes de betalactamasas. Secuencia, concentración y referencia.....	16
Tabla 3. Iniciadores utilizados para la detección de genes de carbapenemasas. Secuencia, concentración y referencia.....	16
Tabla 4. Iniciadores utilizados para la detección de genes de resistencia frente a quinolonas. Secuencia, concentración y referencia.....	17
Tabla 5. Número de genes productores de betalactamasas detectados en las cepas aisladas ..	22
Tabla 6. Número de genes productores de carbapenemasas detectados en las cepas aisladas	22
Tabla 7. Número de genes de resistencia a quinolonas detectados	23
Tabla 8. Patrones de resistencia de las cepas aisladas.....	26

1. Introducción

El consumo de carne en España presenta una serie de variaciones con respecto al de Europa dependiendo del animal de procedencia. Centrándonos en la consumición de carne de cerdo y pollo en el año 2021, sobre las cuales se realiza este estudio, en España se consumen anualmente 9,64 kg y 55,20 kg per cápita respectivamente (MAPA, 2022). Mientras que el consumo medio en la Unión Europea se sitúa en 32,5 kg per cápita para el cerdo y 23,5 kg per cápita para el pollo (Directorate-General for Agriculture and Rural Development, 2021). De lo que se deduce que los españoles consumen más carne procedente de aves que la media europea, y un consumo menor de carne de cerdo que la media europea.

La evolución del consumo de carne a lo largo de los años (Figura 1) demuestra que hay un ascenso en el consumo de pollo tanto total como por persona mientras que para la carne de cerdo estas medidas se mantienen más constantes. Lo cual concuerda con la previsión para el consumo de carnes generado por la UE desde 2021 a 2031 en el que se aprecia un aumento del consumo de carne de ave y una ligera disminución de la carne de cerdo (Directorate-General for Agriculture and Rural Development, 2021).

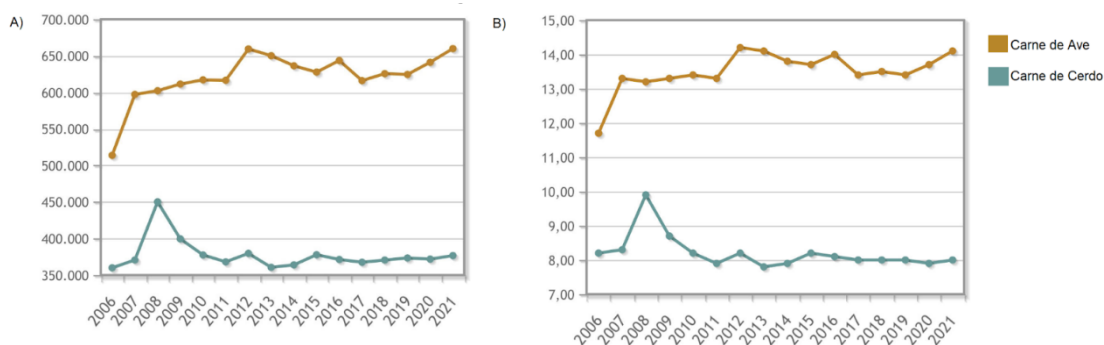


Figura 1. Consumo de carne de ave y cerdo desde el 2006 al 2021. A) Cantidad consumida total (miles de unidades) y B) Cantidad consumida media por persona. Fuente: Instituto Nacional de Estadística (INE)

Este consumo cárnico lleva consigo asociado la aparición de brotes de infecciones bacterianas debido a la contaminación con bacterias patógenas, generalmente zoonóticas. No es extraño encontrarse noticias de brotes de *Salmonella* en los periódicos como el asociado con el consumo de hamburguesas de pollo en dos residencias de ancianos en Madrid afectando a 14 individuos (Medina, 2021). Otro caso muy conocido es el de los pollos contaminados con *Salmonella* producidos en Lominchar (Toledo) por el Grupo Sada que afectaron a cerca de 3000 personas en todas las comunidades autónomas, excepto Melilla y Canarias. 300 de ellas tuvieron que ser hospitalizadas y hubo un fallecido en Valencia (Europa Press, 2011). Estos casos se repiten anualmente en España y esta problemática ya existente solo puede empeorar debido a la aparición de bacterias patógenas resistentes a antibióticos.

1.1. Importancia de la resistencia antibiótica.

El descubrimiento y comercialización de los antibióticos supuso una revolución en el campo de la medicina convirtiéndose en uno de los compuestos más utilizados en muchos ámbitos como el tratamiento de infección, procesos postquirúrgicos, trasplantes... Sin embargo, la presencia cada vez más extendidas de resistencias a estos fármacos supone una verdadera amenaza, es por ello que la Organización Mundial de la Salud (WHO) ha categorizado las resistencias antimicrobianas como una de las tres amenazas más importantes para la salud pública del siglo XXI (Munita & Arias, 2016).

La aparición de las resistencias es un proceso natural pero debido al mal uso de los antibióticos tanto en humanos como en animales y la presión antibiótica que esto genera, este proceso se está acelerando. Lo cual supone un incremento en la dificultad de tratar ciertas enfermedades como neumonía o tuberculosis debido a la pérdida de efectividad de los antibióticos (World Health Organization, 2020). Las infecciones causadas por esta clase de patógenos suponen un aumento en la mortalidad. Cada año en Europa mueren 33.000 personas a causa de infecciones por bacterias resistentes (Ministerio de Sanidad - Gabinete de Prensa - Notas de Prensa, s. f.).

La presencia de bacterias resistentes no deja de extenderse por el planeta aumentando el riesgo de este problema. Se ha descubierto la presencia de cepas resistentes de *Escherichia coli* en heces de pingüinos en el polo sur, así como la presencia de estas en el agua marina de la misma zona (Hernández & González-Acuña, 2016). Este hecho solo se trata de uno de los muchos casos en los que ocurre, como la aparición de cepas resistentes de *E. coli* aisladas en muestras fecales del murciélago de la fruta en Australia (McDougall et al., 2021). La aparición de estos microorganismos resistentes es debido a causa antropogénica, por lo que se puede decir que los humanos estamos esparciendo las resistencias antibióticas por todo el mundo llegando incluso a ecosistemas apenas habitados por humanos y a los animales salvajes (Hernández & González-Acuña, 2016).

1.2. Administración de antibióticos al ganado y la aparición de bacterias resistentes.

Los fármacos que son suministrados a los animales de granja han ido variando a lo largo de los años debido a diferentes razones. A lo largo del siglo pasado los animales eran tratados con antibióticos como la penicilina para tratar la mastitis, pero el principal problema apareció cuando se empezaron a emplear antibióticos, como la estreptomycinina o clortetraciclina, como promotores del crecimiento, para aumentar el crecimiento de los pollos (Xiong et al., 2018). Actualmente, el uso de estos fármacos está restringido, prohibiendo su uso en animales con el propósito de promover el crecimiento e incrementar el rendimiento de la explotación ganadera. Prohibiendo también su uso rutinario para compensar las malas condiciones de higiene (UE., 2019). El consumo de la explotación por encima de un 5% es sancionado (RD 992/2022, 2022). Esta regulación se tuvo que acometer debido a que no solo aquellos animales que padecían ciertas enfermedades eran tratados, sino que todos lo eran para prevenir que se contagiasen y así evitar pérdidas en su producción. Asimismo, su administración para promover el crecimiento se hacía a una concentración denominada sub-terapéutica. Este mal uso prolongado está relacionado con un incremento en la aparición de genes resistentes en las bacterias pudiendo ser transmitidos a seres humanos y al medio ambiente ya que los alimentos de origen animal pueden actuar como vectores de transferencia (González et al., 2019).

Existe una correlación entre esta administración de antibióticos con la aparición de resistencias a los mismos, incluso el uso responsable de antibióticos para tratar animales enfermos puede suponer la aparición de estas resistencias (Bywater 2004). Apoyando esta correlación existen numerosos estudios. Roth et al. (2019) realizó un análisis comparando la resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de aves de corral a lo largo del globo mediante el uso de en diversos estudios realizados en estos países, datos a los que accedieron mediante el uso de diversas organización de ámbito nacional en cada país, incluyendo los mayores productores de esta clase de productos en Europa siendo estos España (Red de Vigilancia de Resistencias Antibióticas en Bacterias de Origen Veterinario (VAV)), Alemania (Federal Office of Consumer Protection and Food Safety), Reino Unido (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la prevención y control de las enfermedades), Polonia (Wasyl et al., 2013; European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2015, 2016) y Francia (French Agency for Veterinary Medicinal Products (ANSES-ANMV)), así como

otros países como Estados Unidos (National Antibiotic Resistance Monitoring System (**NARMS**), China (Chen et al., 2014; Song et al., 2010) y Brasil (Cardoso et al. (2002), Barros et al. (2012), Bezerra et al. (2016), Pessanha and Filho (2001), Stella et al. (2013), and Korb et al. (2015). El uso de antibióticos para engorde lleva prohibido en Europa desde 2006 (European Commission, 2005) y en EE. UU. desde 2017 (AccessScience Editors, 2017), mientras que en China y Brasil su uso sigue permitido. Los resultados de este análisis están condicionados a la cantidad de datos de cada país, siendo menor en Brasil debido al menor número de estudios que se realizan sobre el tema. Pero observando los resultados, en la mayoría de ellos se puede observar un aumento de la resistencia media para aquellos países con menor regulación. El bloque con una mayor diferencia son las resistencias del ácido nalidíxico y quinolonas, mientras que las medias de todos los países están más igualadas en el consumo de ciprofloxacino y fluoroquinolonas. En otro estudio realizado en España (Jiménez-Belenguer et al., 2016) no solo se estudia el efecto de la administración de amoxicilina durante el crecimiento de pollos de engorde sino también la presencia de resistencias antibióticas incluso en pollos recién nacidos debido a la transferencia vertical desde la madre. Para comprobar esto, se aislaron cepas *E. coli* de la cloaca de los animales. En pollos de un día de edad sin administración de antibióticos y se detectaron resistencias en 14 de las 22 cepas de *E. coli* aisladas. A lo largo del crecimiento se crearon 4 grupos, con 3 tratamientos de amoxicilina y un grupo control. En las cepas aisladas de los grupos tratados no se encontraron diferencias significativas, pero si en comparación con el grupo control aumentando estas resistencias ya presentes.

Debido a esta correlación en la aparición de problemas globales de salud se empezó a utilizar el término One Health. Este término es un enfoque en el que se reconoce la estrecha relación entre humanos, animales y el medio ambiente, recalcando entre otras cosas en la relación sobre la salud de estos (One Health Technical Advisory Group, 2022). En este enfoque colaborativo insta a acabar con el mal uso de los antimicrobianos regulando su preinscripción, así como mejorando las condiciones de higiene y el control de las infecciones, acentuando lo necesario que es sacar adelante leyes que regulen su uso. Este proyecto tiene un punto de mira muy crítico sobre la utilización de antibióticos en la ganadería sobre todo en aquellos casos en los que se utiliza para aumentar su crecimiento y no para tratar enfermedades y al igual que la WHO insiste en su cese de uso para este propósito, así como solo administrarse a aquellos animales enfermos y no a los que estén sanos de las mismas instalaciones (McEwen & Collignon, 2018).

1.3. Clasificación de antibióticos según su mecanismo de acción.

Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana

La pared celular de las bacterias está compuesta por peptidoglicano que es un heteropolímero formado por largas cadenas de azúcares. Este es esencial para la pared celular ya que confiere estabilidad y rigidez. Para su síntesis se entrecruzan hebras de glicano mediante la acción de las transpeptidasas (Lima et al., 2020).

β -Lactámicos. Se trata de un grupo de antibióticos cuyo punto en común es la presencia de un anillo betalactámico. Estos actúan en el último paso de la síntesis de los peptidoglucanos de la pared celular bacteriana (Eyler & Shvets, 2019). Esta clase de antibióticos inhibe a las proteínas de unión a la penicilina que son una clase de transpeptidasas. Esta inhibición está basada en las similitudes a nivel estructural, geométrico y estereoquímico entre el sustrato de estas enzimas, D-ALA-D-ALA y el anillo betalactámico (Lima et al., 2020). Este grupo de antibióticos incluye a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y a los monobactámicos.

Glicopéptidos. Se tratan de antibióticos derivados de actinomicetos que poseen en su composición tricíclicos o tetracíclicos de péptidos como núcleo, normalmente estando estos glicosilados y con la posibilidad de incluir una cadena de ácidos grasos (Butler et al, 2014). Estos se unen a la fracción terminal de acil-D-alanil-D-alanina del precursor del peptidoglicano

inhibiendo su unión a las proteínas de unión a la penicilina bloqueando de esta manera la síntesis de proteoglicano (Parenti ,1998). Algunos ejemplos de este tipo de antibióticos son la vancomicina (el primero en ser aprobado), la teicoplanina, la telavancina y la oritavancina (Acharya et al., 2022).

Inhibidores de la síntesis de proteínas

La traducción o síntesis de las proteínas en las bacterias es catalizada por el ribosoma 70S. Este ribosoma está compuesto de dos subunidades 30S y 50S, los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas van a tener como diana terapéutica estas subunidades (Kapoor et al., 2017).

Inhibidores de la subunidad 30S. Los aminoglucósidos son los más destacados de este grupo. Su mecanismo de acción consiste en la unión al sitio A estabilizando lo cual provoca que se una un ARNt incorrecto lo cual conlleva una síntesis incorrecta de las proteínas (Becker & Cooper, 2013).

Inhibidores de la subunidad 50S. Se distinguen tres tipos, cloranfenicol, macrólidos y oxazolidinonas, todos ellos se unen al ARN 23S, lo cual, debido a distintos motivos, como la inhibición de la unión del ARN de transferencia o la inhibición de formar el ribosoma 70S, provocan la inhibición de la síntesis de las proteínas. (Kapoor et al., 2017).

Inhibidores de la replicación del ADN

Quinolonas. Se tratan de antibióticos sintéticos de amplio espectro que fueron obtenidos a partir de la síntesis de cloroquina. El ácido nalidíxico fue el primero de estos fármacos en ser comercializado en 1962 (Naeem et al., 2016). Estos antibióticos inhiben a la ADN girasa encargada de prevenir los superenrollamientos positivos que inhiben la replicación y transcripción. Para poder prevenirlos, provoca roturas en la doble hebra de ADN con su subunidad A y genera superenrollamientos negativos con la subunidad B, por último, vuelve a unir las hembras de nuevo con la subunidad A. Las quinolonas se unen a esta subunidad A inhibiendo su acción. Estos antibióticos son especialmente efectivos contra bacterias Gram positivas ya que tienen gran afinidad por la topoisomerasa IV encargada de esta función (Kapoor et al., 2017).

Inhibidores del metabolismo del ácido fólico

El ácido fólico es un compuesto necesario para el crecimiento celular. Su metabolismo es inhibido por antibióticos como las sulfamidas y la trimetoprima (Kapoor et al., 2017). Actualmente se están investigando otra clase de compuestos que puedan afectar al metabolismo de este compuesto como antagonistas del ácido fólico como los antifolatos (Fernández-Villa et al., 2019).

1.3.1. Antibióticos β -Lactámicos

Penicilinas. La primera en ser descubierta y comercializada es la penicilina G. Sin embargo, es inestable tanto en medios ácidos como en alcalinos por lo que su espectro de acción es reducido. Debido a esto se desarrollaron otra clase de penicilinas como la penicilina V, la cual resiste al pH gástrico por lo que su estabilidad en ambientes ácidos es mayor. También se desarrollaron penicilinas semisintéticas, como meticilina, con la intención de generar terapias contra bacterias que cuentan con una resistencia intrínseca contra estos antibióticos como *Staphylococcus aureus* debido a que presenta betalactamasas. Aunque estos fármacos siguen sin ser de gran utilidad frente a infecciones de bacterias Gram negativas. Esto cambió con el descubrimiento de la ampicilina y la amoxicilina pudiendo tratar infecciones de *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Serratia*... No obstante, hoy en día, existen cepas resistentes a todos los antibióticos mencionados (Lima et al., 2020).

Cefalosporinas. Esta clase de antibióticos posee un anillo dihidrotiazina unido al núcleo betalactámico. Esta adición supone un aumento en la resistencia a la apertura del anillo betalactámico en comparación con las penicilinas. Las cefalosporinas utilizadas como fármacos son semi-sintéticas debido a que la obtenida de forma natural es ineficiente. La primera generación de cefalosporinas es más eficiente contra bacterias Gram positivas, pero también tienen efecto contra algunas bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Mientras que en la segunda generación sí que se observa un aumento de la eficiencia contra bacterias Gram negativas. En cuanto a la tercera generación presenta una mayor estabilidad frente a las betalactamasas en comparación con la primera y la segunda. En este grupo podemos destacar a la cefotaxima. La cuarta generación supone un aumento en la actividad contra las bacterias Gram positivas en comparación con la generación anterior y la última generación, la quinta, está más centrada en el tratamiento de cepas resistentes como *S. aureus* resistente a meticilina (Lima et al, 2020).

Carbapenémicos. Debido a su resistencia a la hidrólisis de la mayoría de las betalactamasas son una de las clases más importantes de β -Lactámicos. Penetran la membrana de las bacterias Gram negativas a través de los canales de porinas, aunque también presenta una actividad de amplio espectro frente a bacterias Gram positivas. El primer carbapenémico utilizado como medicamento es imipenem. Algunos otros carbapenémicos a destacar son meropenem, siendo el primero en resistir la hidrólisis de la DHP-1 humano, tebipenem, el único carbapenémico que se administra por vía oral, doripenem y ertapenem, análogos de meropenem, pero con una mayor vida media (Lima et al, 2020). La resistencia a esta clase de antibióticos se considera una amenaza a la salud pública. Esta resistencia está normalmente distribuida por patógenos Gram negativos como *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae* y *Klebsiella pneumoniae*. *Acinetobacter baumannii* está incluido en la lista de patógenos prioritarios para la creación de nuevos antibióticos bajo la prioridad crítica debido a su resistencia a los carbapenémicos. En esta categoría también están incluidas varias enterobacteriáceas como *Klebsiellas*, *E. coli*, *Serratia* y *Proteus* (OMS, 2017).

Monobactámicos. Esta clase de compuestos puede ser encontrada en la naturaleza, pero el representativo de este grupo se trata de un compuesto sintético conocido como aztreonam. Este fármaco es de amplio espectro frente a bacterias Gram negativas incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* pero no presenta actividad contra bacterias Gram positivas ni en anaerobiosis (Lima et al, 2020).

1.4. Mecanismos moleculares de resistencia, bases genéticas de la resistencia y transmisión de resistencia entre bacterias.

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes o adquirir esta resistencia por mutaciones en el genoma o transferencia horizontal de genes. La resistencia intrínseca a un antibiótico se debe a ciertas características estructurales o funcionales de la bacteria como la ausencia de la diana farmacológica o una composición diferente en la membrana citoplasmática impidiendo la entrada de los fármacos (Blair et al., 2015). Mediante esta transferencia las bacterias patógenas pueden adquirir más de un mecanismo de resistencia, pasando a ser denominadas multirresistentes. Estos microorganismos se consideran multirresistentes por definición cuando in vitro demuestran resistencia frente a más de un agente microbiano, en concreto, a más de tres antibióticos de distintas familias. Las infecciones con esta clase de microorganismos suponen un peor resultado para el paciente (Magiorakos et al., 2012).

1.4.1. Mecanismos moleculares de resistencia frente a antibióticos.

Permeabilidad reducida. Ciertos cambios en las membranas, como la pérdida de porinas o cambios en el contenido de fosfolípidos y ácidos grasos pueden afectar a la incorporación del antibiótico contribuyendo a la aparición de resistencias a estos. (Darby et al., 2023)

Bombas de eflujo. Se trata de proteínas transmembrana capaces de transportar compuestos tóxicos a través de la membrana plasmática, siendo capaces de esta manera de expulsar los antibióticos. Estas bombas contribuyen mayoritariamente a la RAM de las bacterias Gram negativas. (Darby et al., 2023)

Modificación de la diana farmacológica. El método de acción de la mayoría de los antibióticos es la unión directa a su diana inhibiendo su función lo cual se traduce en la inhibición del crecimiento bacteriano y/o su muerte. Por lo que ciertos cambios en la estructura de la diana terapéutica suponen una pérdida en la afinidad de la unión y la aparición de resistencia a ese antibiótico por parte de la célula. En el caso de los β -lactámicos, esta pérdida de afinidad suele deberse a una mutación en los genes que codifican para las proteínas de unión a la penicilina (Darby et al., 2023).

Desactivación del antibiótico. Si la estructura del fármaco está dañada o degradada su eficacia disminuye considerablemente. La desactivación de los β -lactámicos suele producirse por una hidrólisis de estos por la acción de las betalactamasas, unas enzimas capaces de hidrolizar los enlaces que mantienen el anillo betalactámico (Darby et al., 2023).

Modificación del antibiótico. La transferencia de un grupo químico es capaz de inactivar el medicamento (Darby et al., 2023).

1.4.2. Transmisión de resistencia entre bacterias. Transferencia horizontal de genes

Los genes de resistencia a antibióticos se transfieren principalmente por tres mecanismos. Una gran parte de los antibióticos utilizados actualmente para el tratamiento de infecciones bacterianas derivan de aquellos producidos naturalmente por bacterias. La mayoría de estas bacterias productoras de antibióticos son no patogénicas y presentan mecanismo para protegerse de los agentes antimicrobianos que ellas mismas produce. Estos mecanismos se pueden transferir de estas bacterias no patogénicas a bacterias patogénicas que conviven en el mismo ambiente lo cual supone un riesgo para la salud (Guidry et al., 2015).

Transformación. Consiste en la incorporación de ADN desnudo presente en el medio mediante el uso de vesículas de membrana transportadoras y su inserción en el genoma (McInnes et al., 2020). Existen dos principales teorías que intentan explicar la utilidad de este proceso para las bacterias. La primera se centra en que esta transformación ocurre para la reparación de genes, aumentar la diversidad genética y adquirir nuevas características, mientras que la segunda teoría es la utilización de este ADN para su nutrición. Cabe destacar que estas teorías no son excluyentes. (Johnsborg et al., 2007)

Transducción. Se trata del proceso de transferencia de ADN tanto cromosómico como extracromosómico mediante un intermediario conocido como bacteriófago (McInnes et al., 2020).

Conjugación. Es el proceso por el cual elementos genéticos móviles, como plásmidos, son transferidos de una bacteria a otra. Entre estos elementos los más relevantes para la transmisión de genes de resistencia son los plásmidos de conjugación. También puede ocurrir que estos plásmidos transporten genes que contribuyan a la supervivencia como la tolerancia a desinfectantes o a algunos metales pesados (McInnes et al., 2020). Existe una gran variación en el tamaño de estos plásmidos, desde menos de 2 kb a más de 200 kb. Además de poder replicarse independientemente del ADN cromosomal. Por estas razones son una de las principales vías de transferencia de RAM (Schwarz et al., 2017).

1.4.3. Genes de resistencia a antibióticos

La prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en el microbioma es una gran amenaza para la salud pública. No solo presentan una amenaza para el ser humano sino también para los hábitats que habita como en aquellos silvestres o sin presencia humana (Zhuang et al.,

2021). Genes de resistencia frente antibióticos como la ampicilina y la estreptomycin ya han sido encontrados en animales salvajes demostrando la seriedad y el alcance de este problema (Kozak et al., 2009).

1.4.3.1. Genes de resistencia que codifican betalactamasas.

Entre los genes de resistencia frente a los β -lactámicos podemos destacar a *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY2} (Kozak et al., 2009). Estos genes también han sido encontrados en productos cárnicos, por ejemplo, *bla*_{TEM} fue por primera vez aislado de *E. coli* en carne de ternera cruda en 2004. Esta identificación provocó que se llevará a cabo un estudio para monitorizar los niveles de resistencia en España concretamente aquellos de betalactamasas de espectro extendido (Díaz et al., 2010). Más concretamente en productos de origen animal, se analizaron muestras de carne cruda vendidas y se estudió la prevalencia de muestras contaminadas con *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, los resultados demostraron que hubo un incremento constante pasando de un 57% en 2004-2006 a un 93% en 2010 (Egea et al., 2012). Por otra parte, la presencia de betalactamasas de codificación plasmídica como *bla*_{CMY2} en *E. coli* es baja en España y Europa, aunque más elevada en el norte de América (Coque González et al., 2016). Tampoco resulta extraño aislar cepas que presenten alguno de estos genes combinados, como es el caso de TEM y SHV, ambos identificados en cepas de *Klebsiella spp* (Jain & Mondal, 2008).

TEM-1 fue la primera betalactamasa de esta familia y fue caracterizada en 1963 en bacterias resistentes a la penicilina. Esta es capaz de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primeras generaciones. A partir del descubrimiento de TEM-1, se han descrito más de 170 variaciones difiriendo en la secuencia de aminoácidos o en la resistencia fenotípica que otorgan. Estas nuevas variantes confieren resistencia con un mayor espectro incluyendo cefalosporinas de segunda, tercera y cuarta generación, así como monobactámicos y frente a inhibidores de beta-lactamasas (Salverda et al., 2010). Esta familia de betalactamasas se suele encontrar asociada a plásmidos y su vigilancia se hace por tanto esencial (Carattoli, 2009).

Las betalactamasas SHV se pueden categorizar en tres subgrupos: el subgrupo 2b, hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primeras generaciones, pero son inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam; el subgrupo 2br, otorgan resistencia de amplio espectro y son resistentes al ácido clavulánico; y por último el subgrupo 2be, incluyen diversas resistencias de amplio espectro que pueden hidrolizar oximino-cefalosporinas (Liakopoulos et al., 2016). La familia de SHV suele ir asociada a plásmidos (Carattoli, 2009).

En cuanto al gen CMY-2, estos pertenecen a la familia de genes AmpC. Son enzimas capaces de hidrolizar penicilina, pero presentan una mayor actividad frente a las cefalosporinas y cefamicinas. Esta familia también suele ser encontrada en plásmidos (Jacoby 2009).

1.4.3.1. Genes de resistencia que codifican carbapenemasas.

Las carbapenemasas se clasifican en dos grandes grupos de clasificación dependiendo de su perfil hidrolítico: las serina-carbapenemasas y las metalo-betalactamasas. Dentro del primer grupo se pueden encontrar genes de resistencia como *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{OXA}. La mayoría de estos genes se encuentran en elementos genéticos móviles. Estos genes también se pueden encontrar en productos cárnicos, su primera detección data de un estudio realizado entre 2001 y 2021 donde se identificó el gen VIM-1 en 4 aislados de *Salmonella* Infantise, posteriormente se detectaría también este gen en *E. coli*, ambos casos en granjas alemanas (Coque González et al., 2016).

1.4.3.2. Genes de resistencia frente a las quinolonas.

Desde 1998 se han descubierto hasta 3 mecanismos de resistencia diferentes frente a quinolonas mediados por plásmidos. Estos genes, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *qnrVC*, codifican

proteínas de la familia de las repeticiones pentapéptidos. Estas proteínas protegen a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV frente a la inhibición producida por las quinolonas (Jacobi et al., 2014). Esta clase genes también puede ser encontrado en productos de origen animal, como es el caso de aislados de *Salmonella enterica* en productos cárnicos de venta al por menor incluyendo vacuno y pollo y carcasas de vacuno que contenían plásmidos para los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (Adel et al., 2021).

1.5. Resistencias encontradas en productos de origen animal

La presencia de bacterias resistentes en productos cárnicos es una realidad, hay numerosos casos en los que estos hechos han sido descritos incluyendo multitud de cepas de diferentes géneros. La principal preocupación recae en aquellas cepas resistentes que son patógenas para los humanos como el caso de *Salmonella spp.* Aunque el riesgo de transferencia de genes de resistencia entre especies no patógenas a especies patógenas también es una gran preocupación (Guidry et al., 2015).

1.5.1. Género *Salmonella*.

Los microorganismos del género *Salmonella* causan salmonelosis tanto en hombres como animales. Esta familia está compuesta de muchos serotipos, aunque no todos presentan importancia en sanidad animal. Aquello serotipos que si son patológicos son de gran importancia a ser una de las principales toxiinfecciones alimentarias. En humanos se considera una zoonosis que puede producir infecciones intestinales y sistemáticas debido a la ingestión de alimentos contaminados por esta bacteria. Clásicamente estaba asociada con la ingestión de productos de origen aviar, pero en los últimos años se ha dado un aumento de la frecuencia y gravedad de las infecciones asociadas al consumo de productos cárnicos de las especies porcina o bovina (MAPA, s.f.). En 2021, la salmonelosis fue la segunda enfermedad zoonótica más notificada en la Unión Europea con 60050 casos, 3913 de ellos en España, solo por detrás de *Campylobacter spp.* (European Food Safety Authority, et al., 2021).

En países como Irán, (Mir et al., 2022) ya se han aislado cepas de esta especie resistentes a numerosos antibióticos como penicilina, tilosina, tetraciclina, eritromicina y tiamulina en muestras de pollo. Tyson et al. (2017) han descrito genes de resistencias a quinolonas principalmente resistentes a ciprofloxacino en muestras de carne de cerdo comercializadas en Estados Unidos.

En Europa, países como Rumania (Tîrziu et al., 2015) ya han detectado cepas de *Salmonella*, en muestras de pollo, resistentes a 5 antibióticos, tetraciclina, ácido nalidíxico, estreptomycin, sulfametoxazol y ciprofloxacina. Además, presentaban resistencia moderada a trimetoprima. Asimismo, de las 42 cepas aisladas, 30 de ellas presentaban multirresistencia.

En España (Asturias) (Vázquez et al., 2022) se han conseguido aislar cepas de *Salmonella enterica* resistentes a colistina, un fármaco de último recurso utilizado frente a infecciones de patógenos Gram negativos multirresistentes. En este caso las muestras a tratar eran mucho más variables, incluyendo muestras de cerdo, pollo, oveja, huevos, jabalí... De las 231 aisladas, solo 5 presentaron esta resistencia y aunque sea un número bastante bajo, solo un 2,2% sigue suponiendo un gran problema que pone en riesgo este tratamiento. Entre los aislados había presencia del gen *bla_{CMY-2}* pudiendo actuar esta especie como reservorio y vehículo de transmisión a otras especies patógenas a través de la cadena alimentaria.

1.5.2. *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una bacteria presente en el intestino distal de los organismos de sangre caliente. Existen diversas cepas de *E. coli* aunque solo algunas provocan intoxicaciones alimentarias. Aquellas que son patógenas están divididas en 6 clases: *E. coli* enteropatógena

(EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* entero invasiva (EIEC) (Gomes et al., 2016).

Algunas de ellas, como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), mencionada antes como enterohemorrágica, puede causar graves enfermedades transmitidas a partir de alimentos contaminados como la carne cruda, la leche cruda y hortalizas. Este tipo de *E. coli* está principalmente relacionado con el serotipo O157:H7 (ONU, 2018). En la Unión Europea, esta toxiinfección por *E. coli* productora de toxinas Shiga es la cuarta zoonosis más frecuente. En 2020, se notificaron 4446 casos, 74 de estos en España. Se observa una disminución en comparación con años anteriores asociado a la pandemia por COVID-19 (Ministerio de Consumo, 2022). Las *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) que da lugar a la enfermedad conocida como diarrea del viajero, la cual es la principal causa de diarrea en países menos desarrollados especialmente entre niños (CDC, 2014). En principal problema ahora no es solo la carne contaminada con estas bacterias patógenas, sino que están sean resistentes a antibióticos para su tratamiento, lo cual ya está ocurriendo.

En Estados Unidos, (Davis et al., 2018) se realizó una comparación de resistencias entre muestras de pollo y pavo de producción convencional y su versión orgánica, en cuya crianza no se suministraron antibióticos. Se observó que, de los 12 antibióticos utilizados para el estudio, se encontraron resistencias para 10 de ellos, entre los cuales destacaron ampicilina, cefotaxima, ácido nalidíxico y tetraciclina. Se encontraron más resistencias en las muestras de pavo que en las de pollo, hasta un 50% de las *E. coli* aisladas resultaron ser multirresistentes, sugiriendo que el suministro de antibióticos para aumentar el crecimiento era mayor en esta especie. En cuanto a la diferencia entre orgánico y convencional, en pavo sí que se observaba una mayor disminución, pero para el pollo esta variación no era tan significativa.

Aunque no hay que irse a otro continente para encontrar datos acerca de esta clase de bacterias mostrando resistencias fenotípicas contra diversos fármacos. Un estudio (Díaz-Jiménez et al., 2020) realizado sobre 50 muestras de pollo y 50 de pavo comercializadas en Lugo, se aislaron un total de 172 cepas de *E. coli* en medios para detectar bacterias con ESBL, de las cuales 132 presentaron genes de resistencia de la familia SHV, mayoritariamente SHV-12, 13 de ellas también presentaban el gen CTX-M junto al SHV y 3 de las 172 presentaban el gen TEM-42.

En Países Bajos, (Voet et al., 2013) en un análisis realizado sobre carnes de pollo comercializadas, 92 de las 98 muestras estaban contaminadas por *E. coli* de las cuales 12 eran *bla_{CMY-2}* positivas de entre las cuales 10 presentaron resistencias a betalactámicos de amplio espectro.

1.6. Objetivos de desarrollo sostenible

Los objetivos de desarrollo sostenible son un llamamiento universal para poner fin a la pobreza, proteger el planeta y garantizar que para el 2030 todas las personas disfruten de paz y prosperidad, instaurado por las Naciones Unidas en 2015. El aumento en el grado de resistencia de los antimicrobianos representa una amenaza para cumplir alguno de estos objetivos. Este proyecto se ve involucrado específicamente en 4 objetivos (OMS, et al., 2021).

ODS 2 Hambre cero. La presencia de RAM en la ganadería supone una pérdida en la producción lo cual afectaría a los beneficios los cuales también se verían repercutidos por el aumento de los costes de la sanidad animal. Todo esto trae consigo la desestabilización de los medios de subsistencia de los agricultores lo cual puede provocar la pérdida de ganaderías y aún más pérdida de producción afectando a la disponibilidad de este tipo de productos en el mercado. Así como la regulación del uso de antibióticos en animales de ganadería para engorde será fundamental para el control de la expansión de las resistencias (OMS et al., 2021). La meta 2.1 está muy relacionada con este estudio ya que para 2030 se intentará asegurar el acceso a todas las personas a una alimentación sana en la cual no entran alimentos contaminados por

bacterias tanto no resistentes como multirresistentes. Así como la meta 2.4, en la que incluye el aumento de la producción, el cual se verá afectado por las resistencias debido a la necesidad de sacrificar animales o la muerte de estos causada por infecciones (ONU, 2022).

ODS 3 Salud y bienestar. La existencia de cepas resistentes es uno de los grandes problemas y retos del ámbito sanitario. Las infecciones resistentes causan aproximadamente 700000 muertes al año, cifra que aumentará a no ser que la situación se controle. No solo aumentan las muertes, sino el periodo de hospitalización del paciente pudiendo saturar a los hospitales afectando a pacientes que sufran de otra clase de dolencias. Asimismo, esto supone un aumento del gasto, lo cual en ciertos países puede suponer que estos tratamientos se vuelvan inaccesibles para muchas personas (OMS et al., 2021). La principal meta relacionada con este proyecto es la 3.8 ya que la presencia de bacterias multirresistentes aumenta el precio de los costes impidiendo a pacientes acceder a ellos, por lo que lograr la cobertura sanitaria universal debe ser una de las grandes claves para para la transmisión de estas infecciones. La meta 3.9 también puede estar ligeramente relacionada ya que los productos cárnicos también pueden contaminar el agua y el suelo, como por ejemplo con en su producción la presencia de purines que puedan acabar en el agua y el propio desperdicio de alimentos que puede provocar la llegada de estas bacterias al medio (ONU, 2022).

ODS 1 Fin de la pobreza. Las infecciones por patógenos resistentes no discriminan entre el nivel de riqueza, pero sí que afectan más a aquellas personas de bajos recursos ya que son más propensas a padecerlas. Así como el aumento de los costes en los tratamientos puede suponer acabar la situación de pobreza extrema (OMS et al., 2021). La meta del objetivo 1.4, en la que para 2030 se espera garantizar que todas las personas tengan acceso a los servicios básicos incluyendo la sanidad y tratamientos para infecciones como pueden ser las causadas por las bacterias multirresistentes (ONU, 2022).

ODS 12 Producción y consumo responsables. La contaminación alimentaria debida a los microorganismos supone una pérdida de alimentos en las cadenas de producción lo cual afecta directamente a la meta 12.3, en la cual para 2030 se prevé reducir el desperdicio de alimentos per cápita a la mitad (ONU, 2022).

ODS 8 Trabajo decente y crecimiento económico. El aumento de la mortalidad afecta directamente a la oferta de mano de obra lo cual afectaría directamente en la producción económica mundial disminuyendo la (OMS et al., 2021). La principal meta afectada por la expansión de las resistencias sería la 8.1, que trata sobre el aumento del producto interior bruto (PIB) al 7% para aquellos países menos adelantados, el PIB disminuiría debido a esta disminución en la mano de obra derivada del aumento de la mortalidad (ONU, 2022).

Existe otro objetivo que no está tan relacionado con este proyecto en específico, pero existe una relación. Se trata de *Agua limpia y saneamiento*, y es que la contaminación generada por los purines de los animales puede llegar a acuíferos y aguas superficiales y si estos presentan bacterias resistentes este problema solo se agrava (OMS et al., 2021).

2. Objetivos

El objetivo de este proyecto es evaluar el papel de las carnes de pollo y cerdo comercializadas en la ciudad de Valencia como vehículo de transmisión de bacterias que contengan genes de resistencia a antibióticos y en relación con su potencial de transmisión interespecie mediante elementos móviles. Por lo que se plantean los siguientes objetivos secundarios:

1. Asilar bacterias Gram negativas coliformes y *Escherichia coli* mediante medio específico para esta clase de microorganismos.
2. Aislar bacterias Gram negativas del género *Salmonella* mediante el uso de medios específicos para su crecimiento.
3. Aislar bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación en medios selectivos suplementados con dichos antibióticos.
4. Detectar genes mediados por plásmidos que confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CMY2}*), carbapenémicos (*bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*) y quinolonas (*Qnr A*, *Qnr B*, *Qnr S*) en las cepas aisladas de las diferentes condiciones utilizadas.

3. Materiales y métodos

3.1. Origen y preparación de las muestras

A lo largo de este estudio se han analizado 30 muestras diferentes, 16 procedentes de pollo y 14 procedentes de cerdo, de 10 comercios localizados en la ciudad de Valencia (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las muestras utilizadas para este estudio.

Muestra	Comercio	Fecha	Tipo	Tipo de muestra
1	A	06/03/2023	Cerdo	Carne picada
2	B	28/03/2023	Cerdo	Carne picada
3	A	28/03/2023	Cerdo	Carne picada
4	C	25/04/2023	Pollo	Cuello pollo
5	A	25/04/2023	Pollo	Muslos de pollo
6	A	02/05/2023	Pollo	Muslos de pollo
7	A	02/05/2023	Pollo	Cuarto trasero
8	D	02/05/2023	Cerdo	Secreto
9	C	08/05/2023	Pollo	Carne picada de pollo
10	C	08/05/2023	Cerdo	Carne picada de cerdo
11	E	08/05/2023	Cerdo	Cabeza de lomo fileteada
12	E	08/05/2023	Cerdo	Costilla de cerdo troceada
13	F	08/05/2023	Pollo	Muslitos de pollo
14	F	08/05/2023	Cerdo	Cabeza de lomo
15	G	15/05/2023	Cerdo	Cerdo a tacos
16	H	15/05/2023	Pollo	Hígado
17	A	15/05/2023	Pollo	Cuarto trasero
18	G	15/05/2023	Pollo	Solomillos de pollo
19	G	15/05/2023	Cerdo	Filetes de lomo
20	G	15/05/2023	Pollo	Alitas de pollo
21	I	22/05/2023	Cerdo	Cerdo a tacos
22	I	22/05/2023	Pollo	Carcasas de pollo
23	A	29/05/2023	Cerdo	Estofado de cerdo
24	A	29/05/2023	Pollo	Hígado de pollo
25	J	05/06/2023	Cerdo	Troceado para guisar de cerdo
26	H	05/06/2023	Pollo	Cuarto trasero de pollo
27	A	05/06/2023	Pollo	Cuarto trasero de pollo
28	J	05/06/2023	Pollo	Jamoncitos de pollo
29	D	05/06/2023	Cerdo	Chuletas aguja cerdo
30	D	05/06/2023	Pollo	Alas partidas

Para el procesado de las muestras se obtuvieron 25 gramos representativos de cada muestra realizando diversos cortes en asepsia, después estos fueron introducidos en una bolsa Stomacher junto con 225 mL de agua de peptona tamponada (APT) (Scharlau, Barcelona, España). Las bolsas se introdujeron en un homogeneizador de paletas durante 5 minutos y fueron incubadas a 37 °C durante 22±2 horas. Este paso es el conocido como pre-enriquecimiento de la muestra.

3.2. Recuento y aislamiento de coliformes y *E. coli*

El primer análisis realizado fue el recuento de coliformes y su aislamiento, para ello se realizaron diluciones decimales seriadas desde la dilución 1:10 en la bolsa de Stomacher hasta la concentración 10^{-3} . Posteriormente se transfirieron 0,1 mL de cada dilución a una placa con el medio Microinstant® Chromogenic Coliforms Agar Base (CC) (Scharlau, Barcelona, España), utilizando un asa de Digralsky para extender el inóculo. Por último, estas placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

Una vez ha pasado el tiempo de incubación de las placas, las colonias obtenidas de color morado fueron resembradas mediante triple estría en Plate Count (PC) (PLATE COUNT AGAR, Scharlau, Barcelona, España) si estas estaban aisladas, si no lo estaban se vuelve a resembrar en CC para poder ser aisladas, estas dos siembras se realizaron mediante la técnica de la triple estría. Estas placas se incubaron de nuevo a 37 °C durante 24 horas.

3.3. Detección y aislamiento de *Salmonella*

Para el aislamiento de *Salmonella* se siguió el protocolo establecido por la norma ISO 6579:2003/A1:2007.

Una vez las bolsas de Stomacher han pasado 24 horas en la estufa, el siguiente paso fue realizar enriquecimiento selectivo. Para poder realizar esto se necesitó inocular 0,1 mL del caldo en un tubo 10 mL de Rappaport (caldo RVSv) que fue incubado a 42°C durante 24 horas, así como inocular 1 mL del caldo en un tubo de 10 mL de Tetracionato (caldo MKTTn) añadiendo 1 mL de yodo y este fue incubado a 37°C durante 24 horas.

Pasadas 24 h, los dos cultivos realizados en tubo se sembraron en triple estría en medio de *Salmonella* Chromogenic Agar Base (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (Scharlau, Barcelona, España), los cuales fueron incubados durante 24 horas a 37°C.

Aquellas colonias, que crecieron en los medios de *Salmonella* y XLD y que presentaron las características deseadas: Para el medio de *Salmonella* se aislaron aquellas que presentaban un color morado o rosado oscuro, mientras que en el medio XLD fueron aisladas aquellas colonias de color negro y con una ligera transparencia al ser observadas a tras luz. Es decir, aquellas que eran sospechosas de *Salmonella*, fueron sembradas en Agar TSI (Triple Sugar Iron Agar, Merk KGaA, Darmstadt, Alemania), incubado 37°C durante 24 horas. Las que mostraron un patrón de crecimiento esperado para *Salmonella* (amarillo o negro en la base, rojo en el tubo y rojo-rosa en la pendiente) fueron aisladas en PC e incubadas a 37°C durante 24 horas.

3.4. Aislamiento de cepas resistentes a antibióticos Beta lactámicos y carbapenémicos

A partir de las bolsas de Stomacher también se inició el segundo análisis mediante la siembra en triple estría en medio selectivo con antibióticos con la utilización de un asa de siembra que será introducida en la bolsa. Se utilizan 3 medios selectivos: medio cromogénico para la detección de betalactamasas de espectro extendido (ESBL, CHROMagar™, Paris, Francia), MacCONKEY (Scharlau, Barcelona, España) suplementado con cefatoxima 5 mg/L (Mc+C), MacCONKEY suplementado con meropenem 1,5 mg/L (Mc+M). Ambos medios estaban suplementados con Vancomicina 5mg/L para inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se aislaron en PC aquellas colonias que presentaron características morfológicas diferentes como diferentes colores, tamaños y texturas, de nuevo fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

3.5. Identificación bioquímica de las cepas aisladas.

3.5.1. Pruebas bioquímicas previas

Con todas aquellas colonias que aisladas en PC se realizó el mismo procedimiento para seleccionar aquellas cepas de interés para el trabajo e identificarlas. Pasadas las 24 horas de incubación, se realizó una prueba oxidasa y catalasa y por último una tinción de Gram.

Para la realización de la prueba oxidasa se utilizaron unas tiras reactivas de oxidasa (Scharlau, Barcelona) que comprueban si las colonias aisladas presentan el sistema citocromo-oxidasa o no. Esta prueba consiste en la presencia de tetranetil, 1-4, fenildiamina, al entrar este reactivo en contacto con la colonia hay dos opciones, que vire a un color azulado/morado y que resulte en una prueba positiva o que no cambie de color, obteniendo una prueba oxidasa negativo lo cual es lo deseado para este procedimiento.

La segunda prueba consiste en la descomposición del peróxido de hidrógeno por la enzima catalasa, para comprobar la presencia de esta enzima se recogió una colonia y se depositó sobre una gota de H_2O_2 , si aparecieron burbujas el resultado es positivo sino se aparecieron se trata de una prueba negativa. Aquellas colonias que resultaron catalasas positivas fueron seleccionadas para realizar la tinción.

La tinción de Gram se realizó para identificar aquellas colonias que sean Gram negativas y también para comprobar la pureza del cultivo ya que bajo el microscopio sólo se debe de observar un tipo de morfología.

3.5.2. Identificación mediante tiras miniaturizadas API® Biomèrieux

Las colonias seleccionadas para identificación fueron aquellas que presenten una prueba oxidasa negativa, catalasa positiva y tinción de Gram negativa. La identificación se realizó mediante las pruebas bioquímicas miniaturizadas API® 20E (Tiras API, biomèrieux, España). Para realizar este procedimiento se parte de un cultivo puro de 24 horas de donde se extrajo una colonia aislada y se resuspendió en 5 mL de agua estéril. Se procede a llenar los 20 microtubos del sistema con este inóculo, llenando por completo aquellos que se indica (CIT, VP, GEL) y cubriendo con vaselina las pruebas que lo requieran (ADH, ODC, H_2S , URE). Una vez inoculada se incubó a $37^\circ C$ durante 24 ± 2 horas.

A las 24 horas, para obtener los resultados hay que adicionar los reactivos pertinentes a las pruebas, IND, VP y TDA. Estos resultados, que se pueden observar por una varianza o no en los colores de las pruebas (Figura 2). Los resultados son introducidos en la APIWEB, así como el resultado negativo de la prueba oxidasa y se obtiene la identificación asociada a un porcentaje, si este porcentaje es mayor al 90% se consideró fiable sino la colonia fue secuenciada.



Figura 2. Resultados positivos y negativos de las Tiras API 20E. Fuente: APIWEB

3.5.3. Extracción de ADN de las cepas aisladas

Todas las cepas aisladas se volvieron a resembrar en un medio PC que fue incubado durante 24 horas, siendo este el punto de partida para la extracción de ADN. Se recogió media asa de cultivo que fue resuspendida en 1 mL de tampón TE x1. La extracción se realizó utilizando el kit High Pure PCR Template Preparation (Roche, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante.

3.5.4. Identificación molecular mediante el gen 16SrRNA

Para aquellas cepas cuya identificación en la Tira API fue menor de un 90% se realizó una secuenciación parcial del gen 16S ribosomal para su correcta identificación. La secuenciación se realizó mediante dos tipos de PCR dependiendo de la posible especie de la cepa a estudiar.

Si existía una posibilidad de que se tratara del género *Acinetobacter*, se utilizaron los iniciadores 27F y 1525R (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3').

La segunda PCR realizada fue más general utilizando iniciadores universales de bacterias 27F y 1495R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') y las cepas utilizadas fueron las que puedan ser de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las condiciones utilizadas por el termociclador para las cepas *Acinetobacter* fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos (para las fases de desnaturalización, apareamiento y extensión respectivamente) y una extensión final a 72°C durante 10.

Para las cepas de *Enterobacteriaceae* las condiciones fueron algo distintas: 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos a 95°C durante 1 minutos, 55°C durante 1 minutos y 72 ° durante 1 minutos (minutos (para las fases de desnaturalización, apareamiento y extensión respectivamente) y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Por último, para determinar la longitud de los fragmentos se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% con 100 mL de TAE y 5uL de la tinción de ácido nucleico RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Washington, USA) bajo unas condiciones de 90 voltios durante 40 minutos. Posteriormente los productos de la PCR fueron purificados mediante el kit GenElute PCR Clean-up (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) siguiendo las instrucciones del fabricante (Orhan-Yanikan et al., 2019).

Para su identificación una vez obtenidas las secuencias, se realizó un primer paso con el programa Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) eliminando la parte de la secuencia degenerada y por último se realizó un BLAST con esta secuencia contra la base de datos de nucleótidos para obtener la especie con mayor porcentaje de identificación (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.6. Detección molecular de genes de resistencia a antibióticos

3.6.1. PCR para la detección de genes de resistencia a antibióticos β-Lactámicos

La detección de genes de resistencia se realizó mediante una PCR multiplex, detectando más concretamente los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY-2}* (Tabla 2).

Tabla 2. Iniciadores utilizados en la detección de genes de betalactamasas. Secuencia, concentración y referencia.

Gen	Iniciador	Secuencia de los iniciadores	Concentración de los iniciadores	Amplicón (bp)	Referencia
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-f TEM-r	TTAACTGGCGAACTACTTA GTCTATTTTCGTTTCATCCATA	0,2 µM 0,2 µM	247	Kozak et al., 2009
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-f SHV-r	AGGATTGACTGCCTTTTTG ATTTGCTGATTTTCGCTCG	0,4 µM 0,4 µM	393	
<i>bla_{CMY2}</i>	CMY2-f CMY2-r	GACAGCCTCTTCTCCACA TGGACACGAAGGCTACGTA	0,2 µM 0,2 µM	1000	

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL con la concentración de los siguientes reactivos: 1x tampón de reacción NH₄ (BIOTAQTM DNA Polymerase, Bioline), dNTP (dNTP Mix 100mM, Bioline) con 25mM de cada uno, 2,5mM MgCl₂ (BIOTAQTM DNA Polymerase, Bioline), enzima Taq polimerasa (BIOTAQTM DNA Polymerase, Bioline) a 1,25 U y la concentración indicada (Tabla 1) de cada uno de los iniciadores. A estos reactivos se le añadió lo correspondiente de agua MilliQ estéril constituyendo 23 µL del volumen final de la reacción, para completar se añaden 2 µL del ADN extraído previamente de las cepas aisladas. En el control negativo en vez de ADN se añadió agua MilliQ estéril.

Las condiciones utilizadas consistieron en 1 ciclo a 94°C durante 15 minutos, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, por último, un ciclo de 10 minutos a 72°C (Kozak et al., 2009).

Para finalizar, se realizó una electroforesis para determinar la presencia o ausencia de los genes en un gel de agarosa al 1,2%, usando 5 µL de RedSafe™, aplicando una intensidad de corriente de 90 voltios durante 1 hora.

3.6.2. PCR para la detección de genes de resistencia a antibióticos carbapenémicos.

Los genes de resistencia analizados mediante una PCR multiplex fueron *bla_{KPC}*, *bla_{OXA}*, *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* (Tabla 3). El volumen final de esa reacción son 25 µL, siendo 2,5 µL de ADN mientras que los 22,5 µL restantes corresponden al resto de reactivos. Estos reactivos son el tampón de la reacción NH₄ 1x, iniciadores (Tabla 2), dNTPs (0,125 µM), enzima Taq polimerasa (2U/ µL). En el caso del control negativo se adicionan 2 µL de agua MilliQ en vez de ADN.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la detección de genes de carbapenemasas. Secuencia, concentración y referencia.

Gen	Iniciador	Secuencia de los iniciadores	Concentración de los iniciadores	Amplicón (bp)	Referencia
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-f KPC-r	5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' 5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'	0,4 µM	798 232	Poirel et al., 2011
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-f OXA-r	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	0,4 µM	438	
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-f IMP-r	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC3' 5'-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3'	0,4 µM	232	Jiménez-Belenguer et al., 2023
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-f VIM-r	5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3' 5'-CGAATGCGCAGCACCCAG-3'	0,4 µM	390	

Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las siguientes: 10 minutos a 94°C, 34 ciclos formados por 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 55°C y 50 segundos a 72°C, por último, la extensión final se realiza a 72°C durante 5 minutos (Jiménez-Belenguer et al., 2023).

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de electroforesis con el propósito de verificar si los genes estaban presentes o ausentes en un gel de agarosa al 1,2%, utilizando 5 µL de RedSafe™, bajo condiciones que implicaban la aplicación de una corriente de 90 voltios durante 1 hora.

3.6.3. PCR para la detección de genes de resistencia a quinolonas.

En esta PCR mutiplex se analizaron 3 genes, *QnrA* (6 variantes), *QnrB* (6 variantes) y *QnrS* (2 variantes) (Tabla 4). El volumen final de la reacción fueron 25 µL, 2 de ellos siendo el ADN. El resto de los reactivos se añadieron para completar este volumen. Estos reactivos fueron el tampón de reacción NH₄ 1x, MgCl₂ (1,5 µM), dNTPs (200 µM cada uno), los iniciadores (Tabla 3), Taq Polimerasa (2,5U) y agua MilliQ estéril para enrasar. En el caso del control negativo se adicionaron 2 µL de agua MilliQ en vez de ADN.

Tabla 4. Iniciadores utilizados para la detección de genes de resistencia frente a quinolonas. Secuencia, concentración

Gen	Iniciador	Secuencia de los iniciadores	Concentración de los iniciadores	Amplicón (bp)	Referencia
Qnr Am <i>qnrA1 a qnrA6</i>	QnrAm-f QnrAm-r	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	0,2 µM	580	Cartoir et al., 2007
Qnr Bm <i>qnrB1 a qnrB6</i>	QnrBm-f QnrBm-r	GGMATHGAAAATTCGCCACTG TTTGCYGYCGCCAGTCGAA	0,2 µM	264	
Qnr Sm <i>qnrS1 a qnrS2</i>	QnrSm-f QnrSm-r	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	0,2 µM	428	

y referencia.

Las condiciones utilizadas fueron 10 minutos a 95°C, 35 ciclos consistiendo cada uno de 1 minutos a 95°C, 1 minutos a 54°C y 10 minutos a 72°C; y una extensión final de 10 minutos a 72°C (Cartoir et al., 2007).

Por último, se realizó una electroforesis para comprobar la presencia o ausencia de los genes en un gel de Agarosa al 1,2% con 5 µL de RedSafe™ bajo unas condiciones de 90 voltios durante 1 hora.

3.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ha utilizado el software Statgraphics (19). Se ha comprobado la presencia de diferencias significativas entre los genes de resistencia según la carne analizada (pollo o cerdo) mediante ANOVA simples. También mediante el uso de ANOVA multifactorial se comprobaron las diferencias entre los diferentes genes de las mismas familias entre sí.

4. Resultados y discusión

4.1. Aislamiento de cepas

Se han aislado un total de 79 cepas, 52 aisladas de las muestras de pollo y 28 de las muestras de cerdo. Estas cepas fueron aisladas de 22 de las muestras analizadas, quedando ocho de ellas sin presencia de bacterias que cumplan las características esperadas para este estudio; oxidadasa negativa, catalasa positiva y gran negativas.

65 de estas cepas fueron identificadas mediante las tiras miniaturizadas API® 20E mientras que las 15 restantes fueron identificadas molecularmente mediante el gen 16SrRNA. En total se han aislado 16 géneros diferentes incluyendo 22 especies diferentes (Figura 3). La especie más aislada fue *E. coli* con un total de 33 cepas seguida de *Acinetobacter baumannii* y *Salmonella spp.* con 9 y 6 cepas respectivamente. Información más detalla de las cepas aisladas puede ser encontrada en el Anexo I.

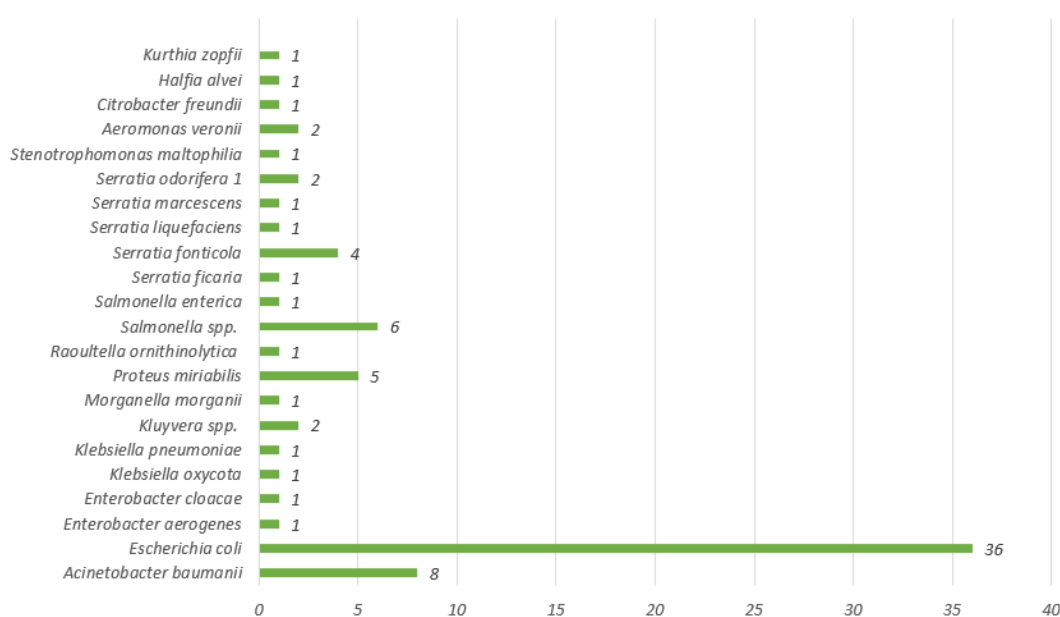


Figura 3. Especies identificadas de las 79 cepas aisladas

4.1.1. Aislados en muestras de cerdo

Casi la mitad de las cepas aisladas de las muestras de cerdo provienen de carne para estofado o guisos con un total de 13 cepas, así como 4 cepas aisladas de carne picada y 3 de preparado de cerdo a trozos sumando un total de 20 (Figura 4). Estos preparados suponen un mayor contacto con maquinaria durante su preparación, en los que existe la posibilidad de que se creen biofilms bacterianos con bacterias como *E. coli*. Esta especie de bacterias puede formar biofilms en diversas superficies y dentro del rango de temperaturas utilizado para la producción de alimentos y su manipulación, estas características han precedido una incidencia mayor de la contaminación de esta especie en las fábricas encargadas de la producción de carne (Giaouris & Simões, 2018), este hecho concuerda con los resultados obtenidos debido a que 8 de estas 13 cepas de *E. coli* se aislaron de carne para estofado. En cuanto a las otras muestras, a pesar de no haber aislados de *E. coli* si se obtuvo presencia de *Salmonella spp.* (4 cepas) junto con *Acinetobacter baumannii* (3 cepas), ambas con capacidad de formar biofilms (Wagner et al., 2020), especialmente el género *Acinetobacter* aislados previamente en su estudio de compañías de carne belgas (Maes et al., 2019). En polietileno, comúnmente denominado plástico y utilizado

como envoltorio para las bandejas de carne comercializadas, *Acinetobacter baumannii* es capaz de secretar más biofilm que en una superficie de acero inoxidable, por lo que no solo puede crecer en las instalaciones de procesamiento y empaquetamiento de la carne sino en el propio empaquetado (Orhan-Yanikan & Ayhan, 2020).

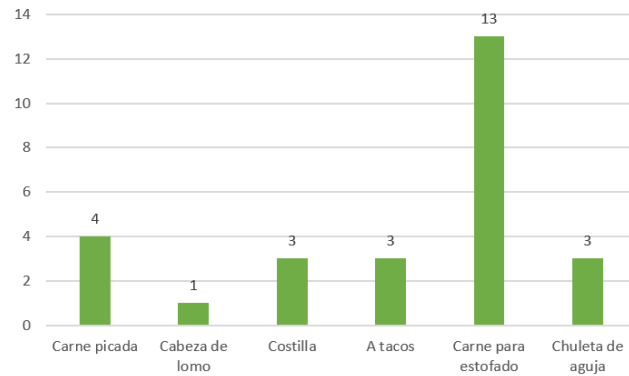


Figura 4. Número de cepas aisladas por tipo de muestra de Cerdo

Entre las cepas identificadas encontramos en menor medida otras especies como *Hafnia alvei*, *Stenotrophomonas maltophilia* y varias especies del género *Serratia*. *Hafnia alvei* es capaz de proliferar en comida refrigerada y ha sido encontrada previamente en tanto en carne picada como otros productos alimenticios como pescado y leche pasteurizada (Lindberg et al., 1998), más recientemente han sido aisladas en Japón (Odoi et al., 2021) en muestras cerdo además con la presencia de resistencia a cefotaxima y ácido naxidilico, en este mismo estudio también se aislaron cepas de diferentes especies de *Serratia* en muestras de cerdo. En cuanto a *Stenotrophomonas maltophilia* también ha sido aislada en muestras de carne, pero en muestras de pollo (Yamamoto et al, 2020). Esta bacteria está posicionada como patógeno nosocomial, es decir, la mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria se adquieren en los hospitales (Corzo-Delgado & Gómez-Mateos, 2006) por lo que su presencia en carnes podría suponer un cambio de posicionamiento de este patógeno pudiendo causar infecciones fuera del ámbito sanitario.

4.1.2. Aislamiento de cepas en muestras de pollo.

La mayor parte de las cepas aisladas de las muestras de pollo (Figura 5) provinieron de las muestras de cuartos traseros esto es debido al contacto de esta carne con la parte visceral del animal especialmente su contacto con la cloaca la cual no puede no ser retirada antes de vender esta clase de alimentos provocando un aumento en la cantidad de cepas presentes.

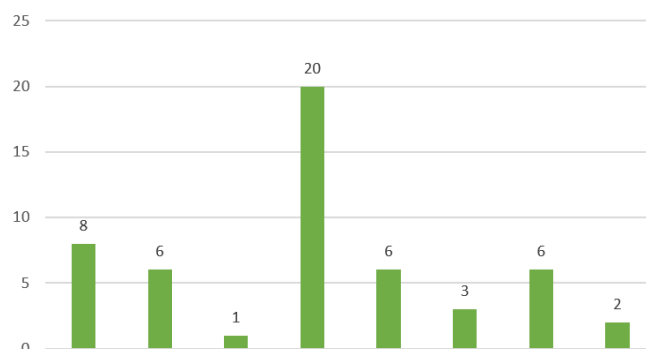


Figura 5. Número de cepas aisladas por tipo de muestra de pollo

En este caso, nos encontramos con algunas especies con mayor presencia que otras, al igual que en el conteo total la más abundante es *E. coli* seguida de *Serratia fonticola* y *Acinetobacter baumannii*. Aunque también hay presencia de algunas especies más inusuales como *Raoultella ornithinolytica*; ya aislada en muestras de pollo fuera de Europa más concretamente Egipto (El-Shannat et al., 2020); *Citrobacter freundii*; esta bacteria se encuentra presente en suelos, aguas, comida incluso en los intestinos de animales y humanos pero causan un rango bastante amplio de infecciones (Liu et al., 2018) aunque los casos más extendidos de infección por esta bacteria suelen provenir de plantas contaminadas (Tschape et al., 1995); *Morganella morganii*; la cual posee resistencia natural frente a antibióticos β -Lactámicos y ya ha sido aislada previamente de carcasas de pollo en EEUU y en pollos de 13 días en Portugal (Palmieri et al., 2020) y *Kurthia zopfii*; la cual ha sido aislada de los intestinos de pollo previamente y en nuestro caso está presente en los cuartos traseros en contactos con la cloaca (Goen & MacLea, 2018).

4.2. Aislamiento de coliformes y *E. coli*.

Un total de 34 cepas han sido aisladas de CC, 23 de pollo y 12 de cerdo (Figura 6). De estas 34 cepas, la mayoría pertenecen a la especie *E. coli* con un total de 30, las últimas 4 cepas aisladas pertenecen a las especies *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens* y *Kluyvera spp* (2 cepas).

Con respecto a la diferencia en especies entre pollo y cerdo, 21 de las *E. coli* provenían de pollo, así como *Acinetobacter baumannii* y una *Kluyvera spp.* y las 9 *E. coli* restantes provenían de cerdo junto con una *Serratia marcescens* y una *Kluyvera spp.* Se ha determinado que no existe ninguna diferencia significativa con respecto al tipo de carne analizado con un p-valor de 0,8640. Más información sobre los análisis estadísticos realizado puede encontrarse en el Anexo II.

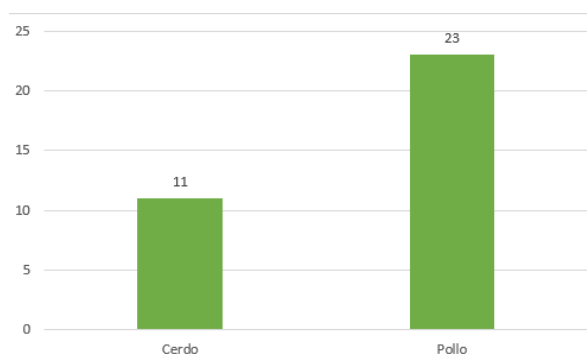


Figura 6. Número de cepas aisladas en medio CC

Como se ha mencionado anteriormente en la introducción existen diferentes serotipos de *E. coli* y esto influye en la patogenicidad de la bacteria. La presencia de *E. coli* en estas muestras no indica que todas sean patógenas con capacidad de provocar infecciones, debido a que no sabemos su serotipo.

4.3. Aislamiento del género *Salmonella*

Se han aislado un total de 14 cepas en medios selectivos para el género *Salmonella*, aunque solo 7 de estas cepas pertenecieron a este género, 6 de ellas siendo de la especie *Salmonella spp.* y una cepa de *Salmonella entérica*. Las 7 cepas restantes están formadas por 3 especies distintas de enterobacterias, 4 *Proteus mirabilis*, una *Enterobacter cloacae* y por último una *Morganella morganii*.

En cuanto a las diferencias entre las muestras de pollo y cerdo, solo 4 bacterias de la especie *Salmonella spp.* se aislaron en cerdo mientras que el resto se aislaron en las muestras de pollo (Figura 7). Mediante la realización de un ANOVA simple se ha determinado que no existe ninguna diferencia significativa entre el aislamiento de cepas en cerdo y pollo con un p-valor de 0,4561. Más información sobre los análisis estadísticos realizado puede encontrarse en el Anexo II.

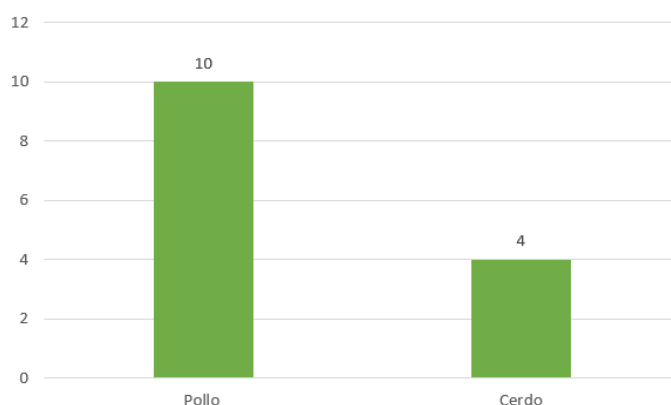


Figura 7. Número de cepas aisladas en medios específicos de *Salmonella*

La presencia de cepas de *Salmonella spp.* en muestras de pollo es esperado debido a la elevada prevalencia de esta clase de patógenos llegando hasta un 33,3%, cifra determinada en un estudio realizado sobre la prevalencia de esta clase de patógenos en carne de pollo a lo largo de Europa. España solo se encuentra por detrás de Turquía que presenta una prevalencia de un 58,3% (Gonçalvaes et al., 2018).

4.4. Detección molecular de genes de resistencia a antibióticos.

4.4.1. Genes de resistencia a antibióticos β -Lactámicos

Se realizó PCR multiplex para la detección de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY2}* sobre las 79 cepas aisladas independientemente del medio utilizado para su aislamiento, es decir, tanto si este era selectivo con presencia de antibióticos como si no lo era. De las 79 cepas, 33 presentaban genes de resistencia estando tanto presente en aquellas cepas provenientes de medios selectivo como no, más información individual de las resistencias presentes en las cepas se encuentra en el Anexo III.

bla_{TEM} se encontró en 22 de estas cepas provenientes de 12 muestras diferentes, presentando la mayor diferencia entre pollo y cerdo (Tabla 5) aunque después de la realización de un ANOVA simple esta diferencia no ha resultado significativa con un p-valor de 0,1871. En cuanto a *bla_{SHV}* ha estado presente en 11 de estas cepas de 7 muestras diferentes, con un número bastante igualado en su presencia (Tabla 5) en pollo, 6, y cerdo, 5, diferencia que no ha sido significativa una vez comprobado mediante la realización de un ANOVA simple con un p-valor de

0,4018. Por último, *bla_{CMY2}* ha sido detectado un total de 10 cepas en 7 muestras distintas estando estos positivos divididos entre pollo y cerdo (Tabla 5) sin diferencia significativa entre pollo y cerdo con un p-valor de 0,2647. Después de la realización de un ANOVA múltiple para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los tres genes analizados, se ha determinado que no hay una diferencia significativa entre *bla_{TEM}* y *bla_{CMY2}* (p-valor 0,0928) ni entre *bla_{SHV}* y *bla_{CMY2}* (p-valor 0,6302), sin embargo, si se ha encontrado una diferencia significativa entre *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}* con un p-valor de 0,0017, estos análisis se realizaron utilizando como factor la carne, es decir si la muestras se trata de pollo o de cerdo. Más información sobre los análisis estadísticos realizado puede encontrarse en el Anexo II.

Tabla 5. Número de genes productores de betalactamasas detectados en las cepas aisladas

	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{CMY2}</i>
Pollo	17	6	5
Cerdo	5	5	5
Total	22	11	10

4.4.2. Genes de resistencia a antibióticos carbapenémicos

La presencia de genes que sintetizan carbapenemasas ha sido estudiada mediante la realización de PCR multiplex detectando los genes *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*, *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}* sobre todas las cepas extraídas.

En la tabla 6 se encuentran las detecciones obtenidas de los genes a estudio, las cepas que presentaron estos genes se encuentran en el Anexo II. Solo se ha detectado el gen *bla_{IMP}* en una de las cepas proveniente de chuleta de aguja de cerdo, no siendo significativa esta diferencia entre pollo y cerdo (p-valor 0,1667). Para *bla_{OXA}* se han detectado 3 cepas, 2 provenientes de cerdo y una de pollo, mientras que para *bla_{VIM}* también se han detectado en 3 cepas, 2 de pollo y una de cerdo. Para ninguno de estos genes la diferencia entre su presencia en muestras de pollo y cerdo ha resultado ser significativa con un p-valor de 0,2317 y 0,9753 respectivamente.

Tabla 6. Número de genes productores de carbapenemasas detectados en las cepas aisladas

	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>
Pollo	0	1	2	3
Cerdo	1	2	1	7
Total	1	3	3	10

Por último, *bla_{KPC}* ha sido el gen más detectado con un total de 10 positivos, 7 en cerdo y 3 en pollo. Este es el único gen que ha presentado una diferencia significativa entre cerdo y pollo con un p valor < 0,05. Esto significa que existe una presencia mayor de *bla_{KPC}* en cerdo en comparación con el pollo, esta diferencia se puede ver más visualmente en el gráfico de medias (Figura 8) en las medias de los dos grupos no solapan.

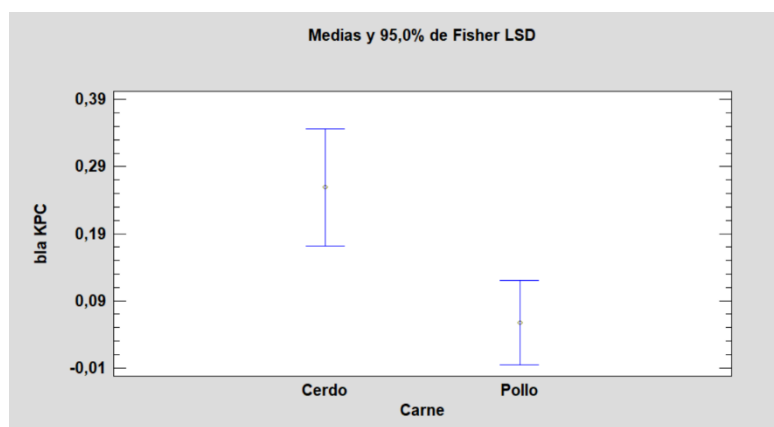


Figura 8. Gráfico de medias resultante del ANOVA simple realizado sobre el gen *blaKPC*

Tras un ANOVA multifactorial se ha determinado que no existe ninguna diferencia significativa entre *bla_{IMP}* y *bla_{OXA}* (p-valor de 0,6669), *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* (p valor de 0,9108), *bla_{IMP}* y *bla_{KPC}* (p-valor de 0,1125), *bla_{OXA}* y *bla_{KPC}* (p-valor de 0,3769) y *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}* (p-valor de 0,8684). Mientras que entre *bla_{OXA}* y *bla_{VIM}* sí que existe una diferencia significativa con un p-valor de 0,0072, todos estos análisis se realizaron utilizando la carne como factor, es decir pollo o cerdo. Más información sobre los análisis estadísticos realizado puede encontrarse en el Anexo II.

4.4.3. Genes de resistencia a quinolonas.

Los genes detectados mediante la PCR multiplex son *Qnr A*, *Qnr B* y *Qnr S*, los cuales incluyen a varias variantes de los genes debido a que contienen un motivo recurrente de cinco aminoácidos en tándem provocando variantes muy parecidas entre si pudiéndose amplificar con solo un primer (Chávez-Jacobo et al., 2015).

Qnr S se ha detectado un total de 17 veces, 13 en pollo y 4 en cerdo, pero esta diferencia no ha sido significativa con un p-valor de 0,3022. En cuanto al gen *Qnr B* solo se ha detectado en pollo para ser exactos en 11 cepas, esta diferencia sí que ha sido significativa con un p-valor de 0,0096 (Figura 9) comprobado tras realizar un ANOVA simple, como se puede observar las medias entre las muestras de pollo y cerdo para este gen no solapan en el gráfico de medias. Por último, *Qnr S* se ha detectado en 27 cepas, 18 de pollo y 9 de cerdo, siendo esta diferencia no significativa con un p-valor de 0,9107. Este gen es el que más se ha detectado teniendo en cuenta los 10 genes a estudiar entre todas las categorías (Tabla 7). Tampoco hay una diferencia significativa entre estos genes con un p-valor de 0,1788 para *Qnr A* y *Qnr B*; de 0,6425 para *Qnr A* y *Qnr S* y de 0,2034 para *Qnr B* y *Qnr S*. Más información sobre los análisis estadísticos realizado puede encontrarse en el Anexo II.

Tabla 7. Número de genes de resistencia a quinolonas detectados

	<i>Qnr A</i>	<i>Qnr B</i>	<i>Qnr S</i>
Pollo	13	11	18
Cerdo	4	0	9
Total	17	11	27

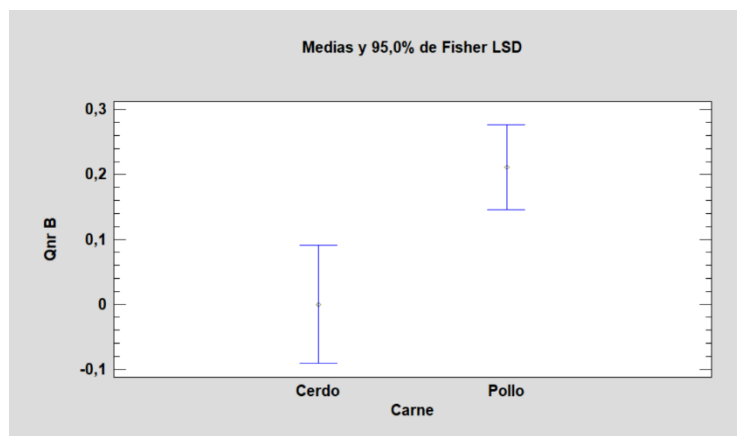


Figura 9. Gráfico de medias obtenido del ANOVA simple realizado sobre el gen *Qnr B*

Además de los ANOVA realizados con el tipo de carne como factor también se han realizado con la especie como factor debido a que se está observando un gran aumento en la presencia de resistencia contra quinolonas en *E. coli* debido al uso tanto en el ámbito sanitario humano como el veterinario lo que llevaría a la aparición de estas cepas resistentes en animales utilizados para la alimentación pudiendo transmitirse a humanos y que los tratamientos utilizados actualmente no sean efectivos (Webber & Piddock, 2001). Por lo que estos análisis se han realizado para observar si hay un aumento en *E. coli* con respecto al resto de cepas aisladas. Los resultados obtenidos demuestran que no existe ninguna diferencia significativa entre las especies. Aunque sí que se ha observado un número elevado de *E. coli* que ha presentado alguno de estos genes de resistencia. Un 87,88% de las *E. coli* aisladas presentaban estos genes. Es por lo que la vigilancia de las resistencias antibióticas en estos productos es necesaria, ya que pueden ser vehículo en la dispersión de las mismas.

4.4.4. Frecuencia de los genes estudiados.

Todos los genes estudiados estaban representados en las muestras (Figura 10). Comparando entre familias de resistencias, los genes de quinolonas fueron los más detectados, seguidos de los productores de betalactamasas y por último los genes productores de carbapenemasas. Los genes más destacados fueron *Qnr S* con casi un 35% de frecuencia y *bla_{TEM}* con más de un 25% de frecuencia.

El aumento en la resistencia frente a quinolonas en muestras procedentes especialmente de pollo, donde se dan la mayor parte de las resistencias, puede estar causada por el uso de fluoroquinolonas como Enrofloxacin en animales enfermos (AEMPS, 2023).

El hecho de que el segundo gen más detectado sea *bla_{TEM}* es acorde con el resultado del estudio realizado por (Lui et al., 2022) en el cual la frecuencia de este gen es del 100% en pollo y del 99% en carnes de cerdo, todas ellas comercializadas en China. Mientras que la frecuencia de otros genes como *bla_{OXA}* y *bla_{SHV}* más baja no superando el 35% para *bla_{OXA}* y el 4% para *bla_{SHV}*, correspondiendo estos resultados con los obtenidos en nuestro estudio debido a la menor presencia de estos genes en comparación con *bla_{TEM}* aunque con una mayor presencia de *bla_{SHV}* en comparación con *bla_{OXA}*.

Aunque una mayor frecuencia de los genes de la familia de productores de carbapenemasas no constituye una ocurrencia habitual. Un estudio realizado en Corea sobre muestras de pollo indica que la frecuencia para los productores de betalactamasas se sitúa en un 10% mientras que no se pudo detectar ninguna cepa productora de carbapenemasas en este

estudio sobre *E. coli* (Kim et al., 2021). En nuestro estudio hay presencia de ambas familias en una frecuencia más elevada, pero siguen la tendencia de menor aparición de genes de resistencia frente a carbapenémicos.

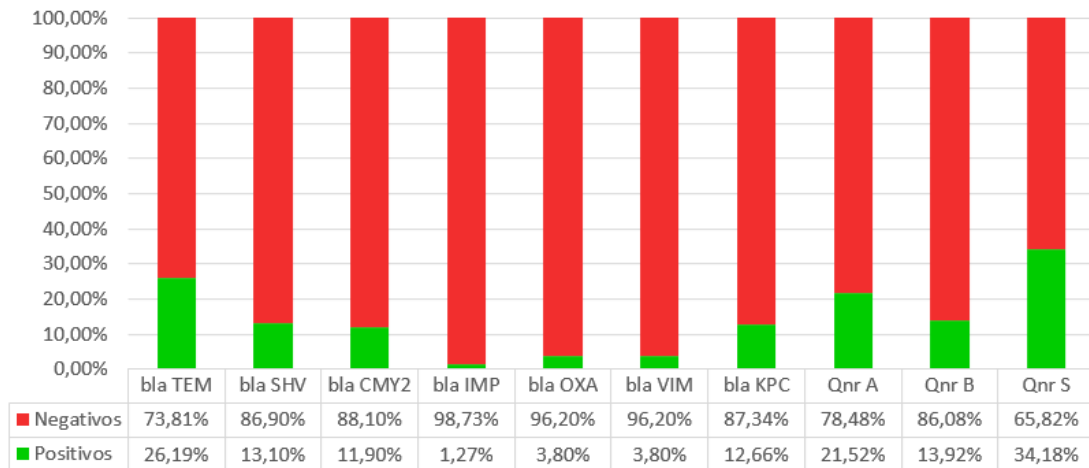


Figura 10. Frecuencia de la detección de los genes estudiados

4.4.5. Patrones de resistencia

Se han detectado 31 patrones de resistencia diferentes (Tabla 8), 24 de ellos han presentado más de un gen de resistencia. De estos 31 patrones, 20 presentan genes de diferentes familias dentro de la misma cepa. Un total de 60 cepas (75,95%) han manifestado genes de resistencia mientras que 25 (31,64%) han mostrado un solo gen de resistencia y 36 cepas (45,47%) más de un gen de resistencia. Un 39,24% de los aislados presentan 2 o más familias de las familias de los genes aislados por lo que presentan desde el punto de vista genético multirresistencia.

Se han aislado un total de 3 cepas con genes de las tres familias, todo con diferentes patrones, una de ellas presenta hasta 4 genes de resistencia. Todas ellas fueron aisladas del medio ESBL. La cepa que presentan 4 genes de resistencia se trata de *Stenotrophomonas maltophilia* (C12E2), patógeno oportunista ya mencionado y en 2012 ya era considerada una bacteria multirresistente emergente (Brooke, 2012).

Tabla 8. Patrones de resistencia de las cepas aisladas

Número de genes de resistencia	Patrones de resistencia	Número de cepas	Cepas
1	<i>bla</i> _{TEM}	2	C22 -1b2; C26 -2.2
1	<i>bla</i> _{CMY2}	4	C13E1; C15 Mc + C; C17E1; C25 Mc + C 1
1	<i>bla</i> _{OXA}	1	C26T
1	<i>bla</i> _{KPC}	2	C21 Mc + C; C23 -1 2.3
1	<i>Qnr A</i>	5	C26 -1.1; C26 -1.2; C26 -3.1; C27 -1.1
1	<i>Qnr B</i>	5	C22 Mc + C; C24E1; C27T; C28E4; C30 -1.1
1	<i>Qnr S</i>	5	C12E1; C20 -1.2; C20 -1b1; C23 -1 1.1; C27R
2	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	2	C10 T Sal 2, C11T Sal
2	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Qnr S</i>	6	C18 Mc + C; C20 -1.1; C20 -3; C22 -1.1; C22 -1a2; C25 -2
2	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CMY2}	1	C25 Mc + C 2
2	<i>bla</i> _{CMY2} , <i>bla</i> _{KPC}	1	C10E1
2	<i>bla</i> _{CMY2} , <i>Qnr S</i>	2	C12 -1; C17 -1
2	<i>bla</i> _{IMP} , <i>Qnr S</i>	1	C29 MC + C 1
2	<i>bla</i> _{VIM} , <i>Qnr S</i>	1	C9.2 Mc + C
2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>Qnr S</i>	1	C23 -1 1.2
2	<i>bla</i> _{KPC} , <i>Qnr A</i>	1	C25 -1
2	<i>Qnr A</i> , <i>Qnr S</i>	1	C23 -2
2	<i>Qnr B</i> , <i>Qnr S</i>	1	C30E3
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>Qnr B</i>	2	C5E3; C6E3
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>Qnr A</i>	2	C26 -2.1; C26 -3.2
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{KPC}	1	C10T Sal 1
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>Qnr S</i>	1	C16E1
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY2} , <i>bla</i> _{KPC}	1	C26R1
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Qnr A</i> , <i>Qnr S</i>	3	C16 -1.1; C16 -1.2; C16 -2
3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Qnr A</i> , <i>Qnr B</i>	1	C30 -1.2
3	<i>bla</i> _{SHV} , <i>Qnr B</i> , <i>QnrS</i>	1	C5E1
3	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CMY2} , <i>Qnr B</i>	1	C17 -3
3	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>Qnr A</i>	1	C25E2
3	<i>bla</i> _{OXA} , <i>Qnr A</i> , <i>Qnr S</i>	1	C29 -1
3	<i>bla</i> _{KPC} , <i>Qnr A</i> , <i>Qnr S</i>	2	C27E1; C27 -1.2
4	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>Qnr S</i>	1	C12E2

4.5. Cepas aisladas pertenecientes a la lista de patógenos prioritarios de la OMS

En 2017, la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos. En esta lista estos patógenos se dividen en 3 prioridades: Crítica, Elevada y Media (OMS, 2017).

En la prioridad 1 o crítica se incluyen aquellas *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos, *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a los carbapenémicos y las

Enterobacteriaceae resistente a carbapenémicas productoras de betalactamasas de espectro extendido. En nuestro estudio, 2 de las 8 *Acinetobacter baumannii* aisladas presentan un gen de resistencia frente a carbapenémicos, C9.2 Mc + C con *bla*_{VIM} procedente de carne picada de pollo y C21 Mc + M con *bla*_{KPC} aislada de una muestra de tacos de cerdo.

Entre las *Enterobacteriaceae* se encuentran géneros como *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus* al igual que la especie *E. coli*. Ninguna de las *E. coli* aisladas presentan tanto genes frente a carbapenémicos como de productores de betalactamasas. En cuanto al género *Klebsiella*, de las dos especies aisladas solo una presenta ambas familias de genes, una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en la que se detectaron *bla*_{CMY2} y *bla*_{KPC}. Se aislaron 5 especies diferentes del género *Serratia*, de las cuales C16E1, *Serratia fonticola*, procedente de cuarto trasero de pollo presenta tanto *bla*_{TEM} como *bla*_{VIM}; y C25E2, *Serratia liquifaciens*, en la cual se detectaron *bla*_{SHV} y *bla*_{KPC}, esta muestra proviene de un preparado para estofado de cerdo. Por último, del género *Proteus* se aislaron 5 *Proteus mirabilis* pero ninguna presenta genes de resistencias frente a antibióticos β-lactámicos y solo una de ellas presenta un gen contra carbapenémicos.

5. Conclusiones

En este estudio se han detectado un total de 22 especies diferentes, mayoritariamente *E. coli*, especie cuya patogenicidad depende del serotipo aislado por lo que no se puede determinar la potencial patogenicidad de las cepas aisladas, sin embargo, desde la perspectiva de la detección de genes de resistencia solo 5 de los 36 aislados no presentaron estos genes por lo que, aunque se trataran de serotipos enteropatógenos o enterotoxigénicos menos graves que enterohemorrágicos y enteroinvasivos, podrían igualmente suponer un gran problema si no hubiera opciones para su tratamiento antibiótico sobretodo en personas inmunocomprometidas y niños.

La segunda especie más aislada fue *Acinetobacter baumannii*, patógeno crítico para la OMS debido a la aparición de cepas resistentes a carbapenémicos, genes que han sido detectados entre estas cepas aisladas, es un resultado preocupante sobre todo si hay contaminación cruzada o la carne no fuera cocinada adecuadamente.

El consumo de estas carnes no cocinadas de forma adecuada supone un riesgo para el consumidor, no solo por la infección que podría causar un patógeno presente, sino debido a que este pronóstico empeora debido a la gran posibilidad de que la infección sea con una bacteria resistente a carbapenémicos, cefalosporinas de 3ª generación o quinolonas debido a que un 75,95% de las cepas presentan al menos un gen de resistencia.

Con respecto a las diferencias entre las resistencias encontradas en pollo y en cerdo, solo se ha determinado para dos de los genes estudiados, *bla_{KPC}* y *Qnr B*, teniendo un número de genes detectado más alto en cerdo que en pollo. Para los 8 genes restantes no se ha encontrado diferencia significativa entre los tipos de muestra.

La aparición de estos genes de resistencia en carnes no solo indica su papel como vehículo de cepas resistentes a antibióticos sino también la posibilidad de transferencia horizontal de estos genes de especies no patógenas a especies patógenas que convivan en el mismo ambiente, lo que conlleva la extensión de estas resistencias, provocando un mayor número de infecciones debidas a bacterias resistentes.

La vigilancia de resistencias antibióticas y en especial de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos como cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos en el contexto de One Health es un aspecto crítico para entender la diseminación de estos genes y la aparición de resistencias a nivel global y encontrar mecanismos para evitar su dispersión y su control.

6. Referencias

1. AccessScience Editors (2017) U.S. bans antibiotics use for enhancing growth in livestock. McGraw-Hill Education; 10.1036/1097-8542.BR0125171.
2. Acharya, Y., Bhattacharyya, S., Dhanda, G., & Haldar, J. (2022). Emerging Roles of Glycopeptide Antibiotics: Moving beyond Gram-Positive Bacteria. *ACS infectious diseases*, 8(1), 1–28. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.1c00367>
3. Adel, W. A., Ahmed, A. M., Hegazy, Y., Torky, H. A., & Shimamoto, T. (2021). High Prevalence of ESBL and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Salmonella enterica* Isolated from Retail Meats and Slaughterhouses in Egypt. *Antibiotics*, 10(7), 881. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics100708>
4. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) (2023) Resumen de las características del medicamento LEVOFLOXACINA 100 mg/ml. https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/1715%20ESP/1715_ESP_ft.pdf
5. Barros, M. R., Silveira, W. D., Araújo, J. M. D., Costa, E. P., Oliveira, A. A. D. F., Santos, A. P. D. S., ... & Mota, R. A. (2012). Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 405-410.
6. Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
7. Becker, B., & Cooper, M. A. (2013). Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS chemical biology*, 8(1), 105–115. <https://doi.org/10.1021/cb3005116>
8. Brooke J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25(1), 2–41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
9. Butler, M. S., Hansford, K. A., Blaskovich, M. A., Halai, R., & Cooper, M. A. (2014). Glycopeptide antibiotics: back to the future. *The Journal of antibiotics*, 67(9), 631–644. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.111>
10. Bywater R. J. (2004). Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 51(8-9), 361–363. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00791.x>
11. Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
12. Cardoso A.L.S.P., Essari E.N.C., Castro A.G.M., Zanatta G.F. Antimicrobial susceptibility evaluation of *Escherichia coli* strains of avian origin/Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária¹⁴ Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 69 (2002), pp. 1-5
13. 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. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(2), 394–397. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm204>
14. Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2014) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Visto el 13 de julio de 2023. <https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>

15. Chávez-Jacobo, V. M., Ramírez-Díaz, M. I., Silva-Sánchez, J., & Cervantes, C. (2015). Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes Codificados en Plásmidos. *REB. Revista de educación bioquímica*, 34(1), 4–9. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952015000100004
16. Chen, X., Zhang, W., Yin, J., Zhang, N., Geng, S., Zhou, X., Wang, Y., Gao, S., & Jiao, X. (2014). *Escherichia coli* isolates from sick chickens in China: changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 202(1), 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.016>
17. Coque González, T.M., López Cerero, L., Moreno Romo, M.A., Torres Manrique, C. Técnicas microbiológicas de detección de microorganismos multirresistentes en animales, alimentos y muestras ambientales. 2016. 58. Torres Manrique, C. (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.
18. Corzo-Delgado, J. E., & Gómez-Mateos, J. M. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 24(1), 1–3. <https://doi.org/10.1157/13083366>
19. Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P. et al. (2023) Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* 21, 280–295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
20. Davis, G. S., Waits, K., Nordstrom, L., Grande, H., Weaver, B., Papp, K., Horwinski, J., Koch, B., Hungate, B. A., Liu, C. M., & Price, L. B. (2018). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC microbiology*, 18(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1322-5>
21. Díaz-Jiménez, D., García-Meniño, I., Fernández, J., García, V., & Mora, A. (2020). Chicken and turkey meat: Consumer exposure to multidrug-resistant Enterobacteriaceae including mcr-carriers, uropathogenic *E. coli* and high-risk lineages such as ST131. *International journal of food microbiology*, 331, 108750. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108750>
22. Díaz, M. A., Hernández-Bello, J. R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., Pascual, A., & Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH) (2010). Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *Journal of clinical microbiology*, 48(8), 2840–2845. <https://doi.org/10.1128/JCM.02147-09>
23. Directorate-General for Agriculture and Rural Development (2021) EU agricultural outlook 2021-31: consumer behaviour to influence meat and dairy markets. *Agriculture and rural development*. Visto el 26 de julio de 2023. https://agriculture.ec.europa.eu/news/eu-agricultural-outlook-2021-31-consumer-behaviour-influence-meat-and-dairy-markets-2021-12-09_en
24. Egea, P., López-Cerero, L., Torres, E., Gómez-Sánchez, M.delC., Serrano, L., Navarro Sánchez-Ortiz, M. D., Rodríguez-Baño, J., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.002>
25. El-Shannat, S. M., El-Tawab, A. A. A., & Hassan, W. M. M. (2020). Emergence of *Raoultella ornithinolytica* isolated from chicken products in Alexandria, Egypt.

- Veterinary world, 13(7), 1473–1479. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1473-1479>
26. Europa Press. (2011). Aumentan las indemnizaciones para los afectados por los pollos con salmonella de la planta de Lominchar (Toledo). Visto el 19 de julio de 2023. <https://www.europapress.es/castilla-lamancha/noticia-aumentan-indemnizaciones-afectados-pollos-salmonella-planta-lominchar-toledo-20110609140920.html>
 27. European Commission (2005) Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. European Commission Press Release Database. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm.
 28. European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control (2022) The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
 29. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2015) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA J., 13, p. 178
 30. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2016) The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA J., 14, p. 207
 31. Eyler, R. F., & Shvets, K. (2019). Clinical Pharmacology of Antibiotics. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 14(7), 1080–1090. <https://doi.org/10.2215/CJN.08140718>
 32. Fernández-Villa, D., Aguilar, M. R., & Rojo, L. (2019). Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. International journal of molecular sciences, 20(20), 4996. <https://doi.org/10.3390/ijms20204996>
 33. Giaouris, E. E., & Simões, M. V. (2018). Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. En A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Eds.), Foodborne Diseases (pp. 309–377). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00011-7>
 34. Goen, A. E., & MacLea, K. S. (2018). Genome Sequence of Kurthia Type Species Kurthia zopfii Strain ATCC 33403T. Microbiology resource announcements, 7(1), e00833-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.00833-18>
 35. Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., Ferreira, L. C., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 47 Suppl 1(Suppl 1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
 36. González, A. C., Espigares, E. & Moreno, E. (2019) Resistencia a antibióticos y su transmisión a través de alimentos de origen animal. Higiene y Salud Ambiental, 19 (2), 1729-1734. [https://saludpublica.ugr.es/sites/dpto/spublica/public/inline-files/bc5ceb8b10b7db3_Hig.Sanid_Ambient.19.\(2\).1729-1734.\(2019\).pdf](https://saludpublica.ugr.es/sites/dpto/spublica/public/inline-files/bc5ceb8b10b7db3_Hig.Sanid_Ambient.19.(2).1729-1734.(2019).pdf)
 37. Gonçalves-Tenório, A., Silva, B. N., Rodrigues, V., Cadavez, V., & Gonzales-Barron, U. (2018). Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. Foods (Basel, Switzerland), 7(5), 69. <https://doi.org/10.3390/foods7050069>

38. Guidry, C. A., Davies, S. W., Metzger, R., Swenson, B. R., & Sawyer, R. G. (2015). Whence Resistance?. *Surgical infections*, 16(6), 716–720. <https://doi.org/10.1089/sur.2014.160>
39. Hernández, J., & González-Acuña, D. (2016). Anthropogenic antibiotic resistance genes mobilization to the polar regions. *Infection ecology & epidemiology*, 6, 32112. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.32112>
40. Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
41. Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology spectrum*, 2(5), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>
42. Jain, A., & Mondal, R. (2008). TEM & SHV genes in extended spectrum beta-lactamase producing Klebsiella species beta their antimicrobial resistance pattern. *The Indian journal of medical research*, 128(6), 759–764.
43. 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 : journal of the W.V.P.A.*, 45(4), 501–507. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1168515>
44. Jiménez-Belenguer, A. I., Ferrús, M. A., Hernández, M., García-Hernández, J., Moreno, Y., & Castillo, M. Á. (2023). Prevalence and Characterization of Beta-Lactam and Carbapenem-Resistant Bacteria Isolated from Organic Fresh Produce Retailed in Eastern Spain. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(2), 387. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020387>
45. Johnsborg, O., Eldholm, V., & Håvarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in microbiology*, 158(10), 767–778. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.004>
46. Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 33(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
47. Kim, H., Kim, Y. A., Seo, Y. H., Lee, H., & Lee, K. (2021). Prevalence and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum-β-Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli from Multiple Sectors of Poultry Industry in Korea. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1050. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091050>
48. Korb, A., Nazareno, E. R. D., Costa, L. D., Nogueira, K. D. S., Dalsenter, P. R., Tuon, F. F., & Pomba, M. C. (2015). Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de Escherichia coli de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35, 258-264.
49. 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-08>
50. Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum β-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in microbiology*, 7, 1374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>
51. Lima, L. M., Silva, B. N. M. D., Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European journal of medicinal chemistry*, 208, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>

52. Lindberg, A. M., Ljungh, A., Ahrné, S., Löfdahl, S., & Molin, G. (1998). Enterobacteriaceae found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International journal of food microbiology*, 39(1-2), 11–17. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)00104-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00104-9)
53. Liu, L. H., Wang, N. Y., Wu, A. Y., Lin, C. C., Lee, C. M., & Liu, C. P. (2018). *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 51(4), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.016>
54. Liu, Z., Wang, K., Zhang, Y., Xia, L., Zhao, L., Guo, C., Liu, X., Qin, L., & Hao, Z. (2022). High Prevalence and Diversity Characteristics of bla_{NDM}, mcr, and bla_{ESBLs} Harboring Multidrug-Resistant *Escherichia coli* From Chicken, Pig, and Cattle in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 755545. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.755545>
55. Maes, S., Heyndrickx, M., Vackier, T., Steenackers, H., Verplaetse, A., & Reu, K. (2019). Identification and Spoilage Potential of the Remaining Dominant Microbiota on Food Contact Surfaces after Cleaning and Disinfection in Different Food Industries. *Journal of food protection*, 82(2), 262–275. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-226>
56. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & 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 : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
57. Maciel, W. C., Bezerra, W. G. A., da Silva, I. N. G., Vasconcelos, R. H., Machado, D. N., de Souza Lopes, E., ... & Oliveira, F. R. (2016). Isolation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O: 6, 8) in broiler chickens. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44, 1-7.
58. McDougall, F. K., Boardman, W. S. J., & Power, M. L. (2021). Characterization of beta-lactam-resistant *Escherichia coli* from Australian fruit bats indicates anthropogenic origins. *Microbial genomics*, 7(5), 000571. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000571>
59. McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
60. McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E., & van Schaik, W. (2020). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current opinion in microbiology*, 53, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>
61. Medina, M. Á. (2021, diciembre 17). Un brote de salmonella en hamburguesas de pollo afecta ya a 14 ancianos de dos residencias de mayores de Madrid. Ediciones EL PAÍS S.L. Visitado el 19 de julio de 2023. <https://elpais.com/sociedad/2021-12-18/un-brote-de-salmonella-en-hamburguesas-de-pollo-afecta-ya-a-14-ancianos-de-una-residencia-de-mayores-de-madrid.html>
62. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2022). Informe del consumo de alimentación en España 2021. Visto el 28 de junio de 2023. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-alimentario-2021-baja-res_tcm30-624017.pdf

63. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (s.f.) Salmonella. Visto el 7 de julio de 2023. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/salmonella/salmonella_general.aspx
64. Ministerio de Consumo (2022) Toxiinfección por Escherichia coli. Visto del 7 de julio de 2023. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/Escherichia_coli.htm
65. Ministerio de Sanidad - Gabinete de Prensa - Notas de Prensa. (s. f.). Visto el 28 de junio de 2023. <https://www.sanidad.gob.es/gabinete/notasPrensa.do?id=4713#:~:text=la%20Medicina%20moderna.,Cada%20a%C3%B1o%2033.000%20personas%20mueren%20en%20toda%20Europa%20como%20consecuencia,anuales%20por%20este%20mismo%20motivo.>
66. Mir, R., Salari, S., Najimi, M., & Rashki, A. (2022). Determination of frequency, multiple antibiotic resistance index and resistotype of Salmonella spp. in chicken meat collected from southeast of Iran. *Veterinary medicine and science*, 8(1), 229–236. <https://doi.org/10.1002/vms3.647>
67. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
68. Naeem, A., Badshah, S. L., Muska, M., Ahmad, N., & Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(4), 268. <https://doi.org/10.3390/molecules21040268>
69. Odoi, J. O., Takayanagi, S., Yossapol, M., Sugiyama, M., & Asai, T. (2021). Third-Generation Cephalosporin Resistance in Intrinsic Colistin-Resistant Enterobacterales Isolated from Retail Meat. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1437. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121437>
70. One Health Technical Advisory Group (2022, 1 de noviembre) Concept Note https://cdn.who.int/media/docs/librariesprovider2/one-health/concept_note_firsttagmeeting_final.pdf?sfvrsn=ee755708_1&download=true
71. Organización de las Naciones Unidas (2022, 24 de mayo). Objetivos y metas de desarrollo sostenible - Desarrollo Sostenible. *Desarrollo Sostenible*. Visto el 30 de junio de 2023. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
72. Organización Mundial de la Salud (2018) *E. coli*. Visto el 7 de julio de 2023. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
73. Organización Mundial de la Salud (2017, 27 de febrero) La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Visto el 22 de julio de 2023. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
74. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2021) LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS Y EL MARCO DE COOPERACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE. Visto el 30 de junio de 2023 <https://www.woah.org/app/uploads/2021/10/unsdcf-amr-guidance-web-final-es.pdf>
75. Orhan-Yanikan, E., Da Silva-Janeiro, S., Ruiz-Rico, M., Jiménez-Belenguer, A., Ayhan, K., & Barat, J. M. (2019). Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents

- against strains present in the meat industry. *Food Control*, 101, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.035>
76. Orhan-Yanikan, E., Gülseren, G., & Ayhan, K. (2020). Protein profile of bacterial extracellular polymeric substance by Fourier transform infrared spectroscopy. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 156(104831), 104831. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104831>
 77. Palmieri, N., Hess, C., Hess, M., & Alispahic, M. (2020). Sequencing of five poultry strains elucidates phylogenetic relationships and divergence in virulence genes in *Morganella morganii*. *BMC genomics*, 21(1), 579. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07001-2>
 78. Parenti F. (1988). Glycopeptide antibiotics. *Journal of clinical pharmacology*, 28(2), 136–140. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1988.tb05737.x>
 79. Pessanha, R. P., & Gontijo Filho, P. P. (2001). Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53, 111-115.
 80. Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
 81. Real Decreto 992/2022, de 29 de noviembre, por el se establece el marco de actuación para un uso sostenible de antibióticos en especies de interés ganadero BOE-A-2022-21136. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2022/11/29/992>
 82. Boletín Oficial del Estado, 299, de 14 de diciembre de 2022, páginas 171044 a 171053. BOE-A-2022-21136. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2022-21136>
 83. Reglamento (EU) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, relativo a productos médicos veterinarios revocando la directiva 2001/82/EC. Diario Oficial de la Unión Europea
 84. Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry science*, 98(4), 1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
 85. Salverda, M. L., De Visser, J. A., & Barlow, M. (2010). Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1015–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x>
 86. Schwarz, S., Loeffler, A., & Kadlec, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary dermatology*, 28(1), 82–e19. <https://doi.org/10.1111/vde.12362>
 87. Song, L., Ning, Y., Shen, J., Fan, X., Zhang, C., Yang, C., & Han, J. (2010). Investigation of integrons/cassettes in antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from food animals in China. *Science China. Life sciences*, 53(5), 613–619. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0109-1>
 88. Stella, A. E., Vitor, T. L., Gadelha, D. F. B. G., Moreira, C. N., Meirelles-Bartoli, R. B., & Oliveira, A. F. (2013). *Escherichia coli* resistente a antimicrobianos isolada de bovinos e aves. *Ars Veterinaria*, 29(4), 14. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2013v29n4p14>

89. Tîrziu, E., Lazăr, R., Sala, C., Nichita, I., Morar, A., Şereş, M., & Imre, K. (2015). Salmonella in raw chicken meat from the Romanian seaside: frequency of isolation and antibiotic resistance. *Journal of food protection*, 78(5), 1003–1006. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-460>
90. Tschape, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., & Böhme, G. (1995). Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiology and infection*, 114(3), 441–450. <https://doi.org/10.1017/s0950268800052158>
91. Tyson, G. H., Tate, H. P., Zhao, S., Li, C., Dessai, U., Simmons, M., & McDermott, P. F. (2017). Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Salmonella Isolated from Swine Ceca and Retail Pork Chops in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(10), e01318-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01318-17>
92. Vázquez, X., García, V., Fernández, J., Bances, M., de Toro, M., Ladero, V., Rodicio, R., & Rodicio, M. R. (2022). Colistin Resistance in Monophasic Isolates of *Salmonella enterica* ST34 Collected From Meat-Derived Products in Spain, With or Without CMY-2 Co-production. *Frontiers in microbiology*, 12, 735364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735364>
93. Voets, G. M., Fluit, A. C., Scharringa, J., Schapendonk, C., van den Munckhof, T., Leverstein-van Hall, M. A., & Stuart, J. C. (2013). Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *International journal of food microbiology*, 167(3), 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.001>
94. Wagner, E. M., Pracser, N., Thalgueter, S., Fischel, K., Rammer, N., Pospíšilová, L., Alispahic, M., Wagner, M., & Rychli, K. (2020). Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *International journal of food microbiology*, 328, 108668. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108668>
95. Wasyl, D., Hoszowski, A., Zając, M., & Szulowski, K. (2013). Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Frontiers in microbiology*, 4, 221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00221>
96. Webber, M., & Piddock, L. J. (2001). Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Veterinary research*, 32(3-4), 275–284. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001124>
97. World Health Organization: WHO. (2020). Antibiotic resistance. Visto el 3 de junio de 2023 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
98. Xiong, W., Sun, Y., & Zeng, Z. (2018). Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental science and pollution research international*, 25(19), 18377–18384. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1852-2>
99. Yamamoto, S., Nakayama, T., & Asakura, H. (2020). Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* CRB139-1, Isolated from Poultry Meat in Japan. *Microbiology resource announcements*, 9(12), e00075-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00075-20>
100. Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental pollution (Barking, Essex:1987)*, 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>