

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y
Medio Natural (ETSIAMN)



***Estudio de sensibilidad antimicrobiana y detección
de genes de resistencia antibiótica en cepas de
E. coli aisladas en producción avícola***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Paola Ripoll Astudillo

TUTOR: Ana Isabel Jiménez Belenguer

TUTOR EXPERIMENTAL: Alejandro Fenollar Penadés

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, JULIO 2017

Tipo Licencia

Se pueden elegir dos tipos de licencia:

1. Reserva de todos los derechos

Se prohíbe la reproducción, transformación, distribución y comunicación pública de la obra

2. Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”.

Esta licencia obliga a la mención de la autoría de la obra; permite la reproducción, distribución y comunicación pública de la obra siempre que no sea con fines comerciales; no permite la elaboración de obras derivadas. El logo que hay que poner es el siguiente:



Más información consultar anexo V Procedimiento repositorio Riunet de la normativa

Estudio de sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de resistencia antibiótica en cepas de *E. coli* aisladas en producción avícola.

Resumen

En las últimas décadas se ha incrementado la preocupación del público por el uso que se hace de los antibióticos debido a la aparición de cepas resistentes que se han propagado y que han ido limitando en algunos casos la efectividad de los antibióticos para tratar infecciones bacterianas en humanos. El tracto gastrointestinal humano es un reservorio importante de bacterias con capacidad tanto de recibir como de transferir genes de resistencia, por lo que es importante tener en cuenta el fenómeno de la transmisión genética horizontal como un riesgo añadido ya que si los alimentos ingeridos están contaminados con cepas bacterianas resistentes éstas pueden llegar al consumidor. En el presente trabajo se estudiaron 191 cepas de *E. coli* procedentes de gallinas reproductoras, con el objetivo de analizar por un lado la susceptibilidad a 8 antimicrobianos distintos mediante la técnica disco-placa, y por otro la detección de genes de resistencia a antibióticos, como son: *TEM*, *SHV*, *CMY-2*, *qnrS* y *ermB*. Los resultados mostraron que el 84,34% de las cepas eran resistentes a al menos uno de los antibióticos y el 18,85% multirresistentes. Los antibióticos para los que más resistencias aparecieron fueron: ampicilina, ácido nalidíxico y tetraciclina, y de los 9 patrones encontrados, NA-AMP-C y NA-AMP-TE fueron los más prevalentes. En el análisis de los genes de resistencia, el gen *TEM*, seguido del gen *qnrS* fueron los que se detectaron en mayor número de cepas y estos resultados coincidieron con los antibióticos para los que aparecieron más resistencias. Finalmente, el estudio de resistencias a antibióticos y la utilización de métodos moleculares de detección de genes de resistencia resultó ser una herramienta eficaz para la caracterización de resistencias antimicrobianas.

Palabras clave: Gallinas reproductoras, resistencias antimicrobianas, genes de resistencia, transmisión *E coli*.

Abstract

In recent years, there has increased public concern about the use of antibiotics due to the emergence of resistant strains that have been spread and it has been restricting in some cases the effectiveness of antibiotics to treat bacterial infections in humans. The human gastrointestinal tract is an important reservoir of bacteria capable of both receiving and transferring resistance genes, it is important to consider the phenomenon of horizontal genetic transmission as an added risk because the food ingested could be contaminated with resistant bacterial strains. In this work, 191 strains of *E. coli* from breeding hens were studied, with the aim of analyzing the susceptibility to 8 different antimicrobials using the disk-plaque technique and, on the other, the detection of antibiotic resistance genes: *TEM*, *SHV*, *CMY-2*, *qnrS* and *ermB*. The results showed that 84.34% of the strains were resistant to at least one antibiotic and 18.85% multiresistant. The antibiotics that showed the greatest resistance were: ampicillin, nalidixic acid and tetracycline, and 9 patterns were found, NA-AMP-C and NA-AMP-TE were the most prevalent. Analysis of the resistance genes showed that the *TEM* gene followed by the *qnrS* gene were detected in higher numbers of strains. These results were in agreement with the antibiotics more prevalent. Finally, the study of antibiotic resistance and the use of molecular methods to detect resistance genes proved to be an effective tool for the characterization of antimicrobial resistance.

Key words: Breeding hens, antimicrobial resistance, resistance genes, *E. coli* transmission.

Dña. Paola Ripoll Astudillo

Valencia, julio de 2017

Prof. Dña. Ana Isabel Jiménez Balaguer

D. Alejandro Fenollar Penadés

AGRADECIMIENTOS

Después de cuatro intensos años, hoy es el día, entrego por fin mi trabajo de fin de grado, lo que significa que ya queda menos para ser graduada en biotecnología. Ha sido un período de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, sino también a nivel personal. Escribir este trabajo ha tenido un gran impacto en mí y es por eso que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante este proceso.

Primero de todo, me gustaría agradecer a mis compañeros de clase que siempre han estado ahí para aconsejarme. Me habéis apoyado enormemente y siempre me habéis ayudado cuando más lo necesitaba. También a los de toda la vida porque gracias a sus consejos y compañía me he convertido en la persona que soy hoy en día.

Además, me gustaría darles las gracias a mi tutora Ana Jiménez por toda la paciencia que ha tenido conmigo, por ofrecerme su valiosa ayuda y por enseñarme tanto sin darse cuenta. Y mi tutor experimental Alejandro, por enseñarme el día a día del laboratorio, ayudarme con cualquier duda, incluso las que no tenían nada que ver con el proyecto y sobre todo por la compañía durante los meses en el laboratorio.

Definitivamente entre todos me habéis brindado todas las herramientas necesarias para completar mi trabajo de fin de grado satisfactoriamente.

También me gustaría agradecer a mis padres y a mi hermana por sus sabios consejos y su comprensión. Siempre habéis estado ahí para mí, sin esperar nada a cambio.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Consecuencias de la resistencia a antibióticos en la salud pública y economía global	2
1.2 Bacterias Gram-negativas y la resistencia a antibióticos	4
1.3 Estrategias para la resistencia a antibióticos en microorganismos	5
• Modificación de los sitios diana de acción	6
• Modificación enzimática	7
• Modificación de la vía de entrada	7
• Sistemas de bombeo	7
1.4 Estrategias para la resistencia a antibióticos en microorganismos	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Origen de las muestras	11
3.2 Selección de cepas de <i>E. coli</i>	11
3.3 Estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos en <i>E. coli</i>	12
3.4 Conservación de cepas de <i>E. coli</i>	13
3.5 Extracción del ADN de <i>E. coli</i>	13
3.6 Amplificación del ADN de <i>E. coli</i> mediante PCR	14
3.7 Comprobación de presencia/ausencia de amplificado por electroforesis	15
3.8 Análisis estadístico de los datos	16
4. RESULTADOS	17
4.1 Estudio de la prevalencia de resistencia a los distintos antibióticos	17
4.2 Multirresistencia y prevalencia de patrones de resistencia	19
4.3 Detección de genes de resistencia	22
4.3.1 Detección de β -lactamasas de amplio espectro de tipo <i>TEM</i> , <i>SHV</i> , <i>CMY-2</i>	22
4.3.2 Detección de genes de resistencia a tetraciclinas: <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i>	24
4.3.3 Detección de genes de resistencia a macrólidos: <i>ermB</i>	25
4.3.4 Detección de genes de resistencia a quinolonas: <i>qnrS</i>	26
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. <i>Concentraciones de los distintos reactivos utilizados en las PCR</i>	14
Tabla 2. <i>Secuencia y tamaño (bp) de los primers de desoxinucleótidos utilizados para la amplificación de los distintos genes</i>	15
Tabla 3. <i>Número de cepas y porcentaje (%) de resistentes a los distintos antibióticos según origen</i>	17
Tabla 4. <i>Patrones de multirresistencia y prevalencia en los aislados según el origen</i>	19
Tabla 5. <i>Prevalencia de los distintos patrones de resistencia en los aislados según el origen</i> ...	21
Figura 1. <i>Productos amplificados por PCR múltiplex en gel de agarosa para los genes que codifican para β-lactamasas TEM, SHV y CMY-2 en 19 muestras de E. coli</i>	23
Figura 2. <i>Frecuencia de los genes TEM, SHV y CMY-2 según origen</i>	23
Figura 3. <i>Productos amplificados por PCR múltiplex en gel de agarosa para los genes de resistencia a tetraciclinas: tet(A), tet(B) y tet(C) en 19 muestras de E. coli</i>	24
Figura 4. <i>Frecuencia de los genes: tet(A), tet(B), tet(C) según origen</i>	25
Figura 5. <i>Gel de agarosa producto de la amplificación mediante PCR del gen ermB en aislado de E. coli</i>	25
Figura 6. <i>Frecuencia del gen ermB según origen</i>	26
Figura 7. <i>Gel de agarosa producto de la amplificación mediante PCR del gen qnrS</i>	26
Figura 8. <i>Frecuencia del gen qnrS según origen</i>	27

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

MDR: Multidrug resistance

UE: Unión Europea

CE: Comunidad Europea

EU: Estados Unidos

G20: El Grupo de los 20

PIB: Producto Interior Bruto

SHV: gen que codifica una β -lactamasa de clase A

TEM: gen que codifica una β -lactamasa de clase A

ESBL: "Extended Spectrum Beta-Lactamase"

ADN: Ácido desoxirribonucleico

qnrS: gen de resistencia a las quinolonas codificada por plásmido

NNIS: National Nosocomial Infections Surveillance

ARN: Ácido ribonucleico

PBP: "Penicillin Binding Protein"

BE: Bombas de eflujo

ARGs: Antibiotic Resistant Genes

GRE: Glycopeptide Resistant Enterococcus

APT: Agua de peptona tamponada

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

EFSA: "European Food and Safety Authority"

PCR: "Polymerase Chain Reaction"

mM: milimolar

μ M: micromolar

CMY: gen que codifica β -lactamasa de clase A

Tet(): gen de resistencia a tetraciclina

ermB: gen de resistencia a eritromicina (macrólido)

dNTPs: desoxinucleótidos

bp: pares de bases

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos se definen según la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2016) como los medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. Con la aparición de éstos surgió el fenómeno de la resistencia a antibióticos que tiene lugar por la presión ambiental que ejercen los antimicrobianos al hacer un indiscriminado o mal uso de los mismos (Department of Health, 2000, UK antimicrobial resistance strategy and action plan, London) consiguiendo que se incrementen los costes médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias e incluso que aumente la mortalidad.

La decreciente aprobación de nuevos agentes antibióticos en la práctica clínica junto con la dificultad que supone tratar enfermedades debidas a bacterias resistentes ha llevado a considerar la resistencia a antibióticos como uno de los problemas más urgentes que presenta la salud pública actualmente (Butler et al., 2001; Organización Mundial de la Salud, 2016) Por lo que el éxito de los antibióticos en la clínica se está viendo comprometido (Rossolini et al., 2014).

En los años 70 cuando el problema se agravó al hacerse evidentes la presencia de muchos organismos infecciosos multirresistentes (MDR) (Wellington et al., 2013). Los hospitales dejaron de ser la única fuente de resistencia a medicamentos, pues estos microorganismos aparecían tanto en cepas clínicas como no clínicas y estas últimas llevarían genes de resistencia los cuales compartirían con otras bacterias en el ambiente, de forma que cada vez aparecerían más microorganismos resistentes (Keen y Montforts, 2011). Por tanto, la resistencia a antibióticos pasó de ser un problema de salud pública a ser también un problema ecológico con respecto al medio ambiente, animales y seres humanos. En los últimos años además se ha producido un aumento del uso de antibióticos en animales de granja para terapia, pues su uso como promotores de crecimiento quedó prohibido en la UE desde 2006 (REGLAMENTO (CE) N° 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, 2003). Esto ha contribuido a aumentar la carga ambiental de microorganismos resistentes, de forma que bacterias con poca importancia clínica se han convertido en amenazas para la salud al contener genes de resistencia los cuales pueden ser transferidos a distintos organismos causando enfermedades (Keen y Montforts, 2011).

Tras el reconocimiento de la resistencia a antibióticos como un problema mundial, en mayo de 2015, la Organización Mundial de la Salud aprobó un plan de acción sobre la resistencia a los antimicrobianos, incluida la resistencia a antibióticos, con el fin de asegurar que se pueda seguir previniendo y tratando enfermedades infecciosas por medio de fármacos

eficaces y seguros. Algunos de los objetivos que persigue son: mejorar la sensibilización y los conocimientos en materia de resistencia a los antimicrobianos; reforzar la vigilancia y la investigación; reducir la incidencia de las infecciones; optimizar el uso de medicamentos antimicrobianos y asegurar que se realicen inversiones sostenibles en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos (Organización Mundial de la Salud, 2016) (Department of Health, 2000, UK antimicrobial resistance strategy and action plan, London) Por su parte, el Instituto de Medicina de Washington publicó en 1998 un informe, 'Antimicrobials Resistance: Issues and Options' el cual afirma que la resistencia a antibióticos generó entre 4 y 5 mil millones de dólares anualmente a la sociedad estadounidense (Harrison y Lederberg, 1998). Además, se afirma que a partir del año 2050 causará la muerte de 10 millones de personas en todo el mundo cada año y costará a la economía global de EU 100 billones de dólares (Keen y Montforts, 2011; O'Neill, 2014). Así, la resistencia a antibióticos se establece como un problema no solo de salud pública, si no, que ha llegado a considerarse uno de los cinco factores más influyentes en la economía según el Comunicado de la Cumbre del G20 celebrada en Hagzhou, China, en 2016 (Laxminarayan et al., 2016a).

Por todo ello, tal y como afirma el acuerdo con la Reunión de Jefes de Estado de la Asamblea General de las Naciones Unidas de septiembre de 2016 (Laxminarayan et al., 2016a), para acabar o al menos minimizar la resistencia a antibióticos se requiere una colaboración de todos los sectores de la sociedad, incluyendo gobiernos, investigadores, y sobre todo los ámbitos de la salud humana, animal y agricultura (Keen y Montforts, 2011). Para ello es necesario promover el desarrollo de nuevos fármacos, mejorar la idoneidad de los antimicrobianos a utilizar y reducir su uso en la mayor medida posible, pues, aunque se está consiguiendo reducir la prescripción primaria de antibióticos, ésta sigue siendo la responsable de la mayoría de los antibióticos prescritos (Prescription Pricing Authority, Trends in antibiotic prescribing in England, 2006). Por ejemplo, más del 70% de la población estadounidense recibe antibióticos tras presentar una infección respiratoria aguda, cuando está demostrado que los antibióticos solo ofrecen un beneficio menor para este tipo de infecciones (Keen y Montforts, 2011). Así si no modificamos el uso actual que hacemos de ellos, seguirán representando una grave amenaza (Harrison y Lederberg, 1998).

1.1 Consecuencias de la resistencia a antibióticos en la salud pública y economía global.

Los efectos sobre la salud derivados de la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos patógenos ya se están poniendo de manifiesto en todo el mundo. En 2014 se

sabía que aproximadamente 50.000 muertes por año tenían lugar a causa de este problema, considerando únicamente Europa y Estados Unidos y en 2016 ya hablamos de más de 700.000 muertes en todo el mundo atribuibles a patógenos bacterianos cada año (Laxminarayan et al., 2016b). Por ejemplo, en más de 15 países europeos en el año 2007, una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) resistente a antibióticos generó el 9,3% de todas las infecciones bacterianas, siendo responsable de 2.712 fallecimientos (European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial Resistance Interactive Database (EARS-NET), 2013).

El consumo mundial de antibióticos en medicina humana aumentó casi un 40% entre 2000 y 2010, según la OMS. Cualquier uso de antimicrobianos, aunque éste sea apropiado, contribuye al desarrollo de resistencias, pero, es cierto, que este problema se agrava al hacer un uso innecesario y excesivo de los mismos. El uso indebido además se facilita por tener lugar la disponibilidad, en muchos lugares, de agentes antimicrobianos sin receta médica (Van Boeckel et al., 2014). Además, como ocurre con todas las enfermedades infecciosas, el volumen de los viajes internacionales que tienen lugar hoy en día crea nuevas oportunidades para que los patógenos resistentes a antibióticos se propaguen a nivel mundial, y lo que es peor, la oportunidad de compartir su material genético entre bacterias, creando nuevas cepas resistentes muy rápidamente. Por ello, abordar el problema de la resistencia a antimicrobianos a nivel mundial es imprescindible.

Es necesario, a su vez, afrontar este problema desde la perspectiva económica. Actualmente se ha estimado que, si la tendencia actual no se modifica, para 2050 provocará la muerte a aproximadamente 10 millones de personas/año y producirá una reducción del 2 al 3,5% del Producto Interior Bruto (PIB). Esto costaría a la economía global hasta 100 mil millones de dólares (O'Neill, 2014). Todo ello sin considerar los costes sociales y de salud que derivarían de este problema.

También, al mencionar la repercusión económica que supondría no poner fin a este problema, es necesario resaltar la importancia del sector avícola en España a nivel económico. La cría de aves para producción de carne es, en la actualidad, una de las ganaderías más importantes de nuestro país. España se encuentra entre los primeros productores europeos de carne de ave. También la avicultura de puesta representa una actividad ganadera de primer orden, aportando a la renta agraria una cifra de 972,4 millones de euros en 2011, lo que le configura como un sector firmemente implantado y consolidado en la economía ganadera nacional. Es por eso que se puede afirmar que el aumento de resistencias en animales de

granja afectaría además de a la salud animal y humana, a una parte importante de la economía de nuestro país (Organización agraria Coag, 2012).

Por todo ello, aunque el impacto humano de la resistencia a antimicrobianos es más que suficiente para justificar una intervención inmediata, los estudios económicos sobre cómo afecta la resistencia a antibióticos pretenden demostrar que se trata de un tema que trasciende a la política de salud. Incluso sobre una base estrictamente macroeconómica, tiene sentido que los gobiernos actúen ahora, trabajando conjuntamente con la comunidad científica y profesionales de la salud, para que todos entiendan el valor y los posibles efectos secundarios de los antibióticos y conseguir hacer frente al aumento de la resistencia a éstos.

1.2 Bacterias Gram-negativas y la resistencia a antibióticos.

En los últimos años ha tenido lugar un aumento de la resistencia a agentes antimicrobianos utilizados para tratar patógenos gram-negativos. Además, cada vez aparecen con más frecuencia patógenos multirresistentes, como es el caso de *E. coli* o *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) que a menudo combina múltiples mecanismos para dar lugar a una resistencia de amplio espectro (Hawkey y Jones, 2009).

Entre los mecanismos más comunes de resistencia en patógenos gram-negativos encontramos la producción de β -lactamasas (Luvsansharav et al., 2011). Se trata de unas enzimas hidrolíticas que degradan el anillo β -lactámico que conforma la estructura de este tipo de antibióticos, entre los que destacan: penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos. Las β -lactamasas están codificadas cromosómicamente en muchas bacterias ambientales, pero se encuentran con más frecuencia en plásmidos (Mainous y Pomeroy, 2010). La distribución generalizada y el significado clínico de esta familia de genes atestiguan el importante papel de las fuentes ambientales, resistencias movilizables y la facilidad con la que establecen crisis internacionales (Peter et al., 2009).

E. coli es un productor común de β -lactamasas. Las encontramos en gran cantidad de aislados clínicos y constituyen unas enzimas de amplio espectro (*TEM-1*, *SHV*). Estas enzimas están mediadas por plásmidos y, por lo tanto, se pueden propagar a otras, o desde otras bacterias, mediante la transferencia horizontal (Mainous y Pomeroy, 2010).

La introducción en 1960 de penicilinas sintéticas, resultado de la combinación con inhibidores de β -lactamasas codificadas cromosómicamente, permitió durante un tiempo combatir con éxito muchas infecciones causadas por *Enterobacteriaceae*, pero poco después

β -lactamasas codificadas por plásmidos, especialmente *TEM*, originaron resistencias. Como resultado tuvo lugar un uso incrementado de aminoglucósidos, cefalosporinas y quinolonas, y con ello las bacterias desarrollaron nuevas resistencias a éstos (Wellington et al., 2013).

A pesar de los avances en el descubrimiento de fármacos contra agentes capaces de producir β -lactamasas generadas por bacterias gram-negativas, mutaciones puntuales en los genes que median la producción de estas enzimas han conseguido dar lugar a las β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs). Las ESBLs se observan más comúnmente en *E. coli* y *Klebsiella spp.*, pero han proliferado en otras bacterias gram-negativas también (Taha et al., 2015). De hecho *E. coli* se encuentra entre las bacterias productoras de ESBL más comunes en la práctica clínica (Mainous y Pomeroy, 2010). El gran aumento de ESBL después de principios de los años 2000 en Europa ha sido uno de los fenómenos más dramáticos en la resistencia a los antimicrobianos (Hawkey y Jones, 2009).

De forma similar a las β -lactamasas, la resistencia codificada por plásmido a las fluoroquinolonas ha aumentado significativamente durante la última década. Los mecanismos de resistencia utilizados se basan principalmente en alteraciones en la diana de acción, ADN girasa y topoisomerasa IV, por parte del patógeno. Aunque también encontramos bombas de eflujo, especialmente en *P. aeruginosa*, como estrategia de resistencia (Mainous y Pomeroy, 2010). Pero este aumento en la resistencia a fluoroquinolonas, se debe en gran parte a la aparición de genes *qnr* que codifican proteínas repetidas de pentapeptidos que se unen al ADN de la bacteria y lo protegen contra el daño inducido por el antibiótico (Strahilevitz et al., 2009; Minh Vien et al., 2009).

La resistencia a las fluoroquinolonas entre las cepas clínicas de *E. coli* ha ido en aumento en los últimos años. En 2004, según la Vigilancia de Infecciones Nosocomiales Nacionales (NNIS), casi el 10% de las cepas de *E. coli* aisladas eran resistentes. Además, en las cepas que también albergan ESBLs, las tasas de resistencia son aún más altas (Mainous y Pomeroy, 2010).

1.3 Estrategias para la resistencia a antibióticos en microorganismos.

Podemos clasificar a los antibióticos en función a su estructura química, donde los más empleados son: quinolonas, β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), anfenicoles (cloranfenicol), tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos y glucopéptidos. Para estudiar las distintas estrategias que los microorganismos siguen a la hora de crear resistencias frente a los

antibióticos es necesario conocer cuáles son las dianas de acción de éstos. Los agentes antimicrobianos actúan sobre diferentes regiones de la célula, descritas a continuación (Chopra, et al.; 2002):

Pared bacteriana. Actúan bloqueando la síntesis del peptidoglicano, constituyente esencial de la pared, de forma que las bacterias pierden su protección osmótica y lisan. A este grupo pertenecen los β -lactámicos, glucopéptidos, bacitracina y estreptograminas.

Membrana bacteriana. Actúan formando poros en la membrana de forma que se rompe su integridad, se destruyen así los gradientes de iones necesarios para obtener energía y se produce la pérdida de solutos celulares. Algunos de los agentes que utilizan este mecanismo son las polimixinas y la nisina.

Síntesis de proteínas. Boquean la síntesis de proteínas a distintos niveles. Aminoglucósidos y tetraciclinas actúan induciendo errores en la lectura de la información aportada por el ARN mensajero o alterando las membranas; el cloranfenicol, inhibe a la transpeptidasa; y macrólidos y lincosamidas inhiben la translocación.

Síntesis de ácidos nucleicos. Interfieren en las funciones del cromosoma bacteriano. Las sulfamidas y trimetoprima impiden la síntesis de purinas; las fluoroquinolonas impiden el superenrollamiento, al inhibir la girasa; y los nitromidazoles actúan ocasionando la disrupción de las cadenas de ADN.

Frente a la aparición de los antibióticos e incluso antes de ésta, surgieron las resistencias (Abraham y Chain, 1940). Los mecanismos más comunes y que causan la mayor parte de la resistencia antimicrobiana son: modificación de la diana de acción, inactivación del antibiótico y cambios en la absorción o eflujo de éstos por el microorganismo. Cada organismo puede utilizar una o más de estas estrategias, que se detallan a continuación (Daza, 1998):

a. Modificación de los sitios de acción.

Tiene lugar cuando el agente consigue alcanzar su diana, pero no actuar sobre ésta, debido a una reducción de la afinidad del receptor por la molécula de antimicrobiano. Un ejemplo sería la modificación de PBP (proteína unidora de penicilinas) de la cual depende la penicilina para llevar a cabo su acción.

b. Modificación enzimática.

Consiste en la inactivación de los antibióticos a partir de enzimas producidas por las bacterias. Encontramos en este grupo: las β -lactamasas y otras enzimas como metilasas, acetil-transferasas, fosfotransferasas, etc.

c. Modificación de la vía de entrada.

Se produce la reducción de la permeabilidad de la membrana o pared celular disminuyendo la captación de antibióticos. Por ejemplo, la modificación de las porinas reduce la entrada celular de antimicrobianos.

d. Sistemas de bombeo.

También existen resistencias que surgen de mejorar la salida de los fármacos al exterior de la célula, como es el caso de las bombas de eflujo (BE), que entre las diversas moléculas que expulsan pueden encontrarse los antibióticos. La resistencia a tetraciclinas se produce generalmente de esta forma.

Además de las estrategias de acción, es necesario resaltar que existen distintos cambios genéticos que tienen lugar en los microorganismos y que conducen a la resistencia a los antimicrobianos. Estos cambios se establecen por la selección que ejerce la presencia del antibiótico en las poblaciones de microorganismos. Podemos clasificarlos en tres grupos: mutaciones cromosómicas de genes de resistencia comunes, adquisición de genes de resistencia llevados en plásmidos y otros segmentos genéticos intercambiables, y la expresión inducible de genes existentes (Séveno, et al., 2002)

1.4 Transferencia horizontal de genes entre animales de granja y humanos.

El aprovechamiento de los antibióticos en la agricultura y la reproducción de animales constituye cada vez más un problema a nivel mundial, tanto desde el punto de vista de la salud y el bienestar de los animales como por el desarrollo de resistencia a los antibióticos en patógenos animales (Ibrahim et al., 2016). Teniendo en cuenta que existen claras evidencias acerca de la movilización horizontal de genes entre microorganismos de distintas poblaciones, (Moubareck et al., 2003a; Smith et al., 2002) es lógico pensar que existe un vínculo entre la resistencia ambiental y la clínica (Davies, 2013).

La resistencia a antibióticos está mediada por genes de resistencia a antibióticos (ARGs). Uno de los reservorios de mayor importancia se encuentra constituido por las

bacterias intestinales de los animales de granja. En Estados Unidos, se estima que el 80% de los antibióticos eran usados tanto en terapia como en promoción de crecimiento en animales en 2002 (Moubareck et al., 2003a; Smith et al., 2002) y en Reino Unido de 2006 a 2011, a pesar de que en 2006 se prohibió por parte de la UE el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en los animales (REGLAMENTO (UE) N° 37/2010 DE LA COMISIÓN, 2014), se utilizaron aproximadamente 400 toneladas de antibióticos anualmente en el tratamiento de animales productores de alimentos (Wellington et al., 2013), que es superior a la cantidad utilizada en seres humanos (Liebana et al., 2013). Además, el estiércol animal también contiene una cantidad importante de bacterias resistentes a antibióticos (Aarestrup et al., 1998; Binhet al. 2007; Ghosh and LaPara 2007) y se estima que 70 millones de toneladas anuales de estiércol animal son usadas como fertilizantes en tierras agrícolas en Reino Unido (Hutchison et al. 2004), lo que supone una fuente de diseminación de bacterias resistentes al medio ambiente. Es por todo ello que los animales de granja y sus ambientes siguen considerándose en la actualidad una enorme reserva de ARGs. Los tres principales mecanismos de resistencia detectados en estas granjas son las bombas de eflujo, la desactivación de antibióticos y la protección celular (Hu et al., 2017).

Otro reservorio a considerar son las bacterias intestinales humanas (Salyers et al., 2004). En éste se producen intercambios de ARGs entre las bacterias comensales, y también mediante transferencia horizontal pueden llegar a bacterias que están simplemente de paso en el intestino, de forma que, estos portadores de ARG van a poder circular por todo el microbioma humano o incluso diseminarse a otros entornos.

E. coli es un comensal entérico común, cepas específicas de ésta pueden causar enfermedades humanas y animales y adquiere fácilmente resistencia, por lo tanto, puede actuar como un reservorio transfiriendo resistencia a otros microorganismos (Aarestrup et al., 1998). Siendo de particular preocupación la aparición y propagación de *E. coli* productor de ESBL asociado con ganado y otros animales de granja (Liebana et al., 2013; Bush y Jacoby, 2010; Pfeifer et al., 2010).

Distintos estudios han puesto de manifiesto la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos. Uno de ellos mostró que más de 40 ARGs se transfirieron entre humanos y aislados de granja (Smillie et al., 2011), mientras que otro, a través del estudio a gran escala de datos de genomas bacterianos, demostró que el intercambio de ARGs más común es el que se produce entre animales y humanos (Hu et al., 2017). En otro estudio encontraron un total de 84 ARG, los cuales ofrecen resistencia a seis clases distintas de

antibióticos: aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicoles, β -lactámicos, sulfonamidas y donde destacan las tetraciclinas. Entre las especies que albergaron el mayor número de ARGs compartidos entre humanos y animales se encontraba *E. coli* (Hu et al., 2016).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que también existe la propagación de resistencias asociadas a alimentos. Un estudio mostró el hallazgo de enterococos resistentes a glicopéptidos (GRE) en seres humanos no hospitalizados y en los consumidores de carne, pero no en los vegetarianos (Laxminarayan et al., 2016b). Otro, después de la ingestión de alimentos que contenía GRE de origen animal por voluntarios sanos reveló la presencia de tales cepas en heces humanas durante períodos prolongados de tiempo (European Centre for Disease Prevention and Control, Antimicrobial Resistance Interactive Database (EARS-NET), 2013). También se ha demostrado que varios genes de resistencia pueden ser transferidos de forma conjugada de una cepa de *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) de origen animal a una cepa humana de la misma especie en los tractos gastrointestinales de ratones con mucha facilidad (Moubareck et al., 2003b).

Todo ello pone de manifiesto que, debido al incremento del uso de antibióticos en animales de granja, se están originando gran cantidad de genes de resistencia en animales y éstos pueden ser propagados posteriormente a los seres humanos constituyendo una gran amenaza para la salud pública. De ahí la importancia del estudio de este tipo de animales para conocer el gran papel que desempeñan en la diseminación de ARGs.

2. OBJETIVOS

Los agentes antimicrobianos utilizados en los animales productores de alimentos en Europa son con frecuencia los mismos, o pertenecen a las mismas clases, que los utilizados en la medicina humana. El uso excesivo de los mismos tiene como principal efecto secundario la resistencia a antibióticos, el cual resulta de la selección positiva de bacterias resistentes, ya sean patógenos, comensales o incluso bacterias ambientales. Todo esto modifica la estructura poblacional de las comunidades microbianas, llevando a tendencias evolutivas aceleradas con consecuencias impredecibles para la salud humana y animal (Hanon, et al., 2015).

Este trabajo tiene como objetivo estudiar tanto la susceptibilidad a distintos antimicrobianos como algunos genes de resistencia a los antibióticos de mayor relevancia en cepas aisladas de *E. coli* de gallinas. De esta forma se conseguirá tener información tanto sobre el uso seguro de estos antibióticos en clínica y en ganadería como el avance de las resistencias antimicrobianas en dicho ámbito.

Estos análisis suponen un importante paso de prevención con el cual poder tomar repercusiones frente a las resistencias antimicrobianas y adoptar las medidas más oportunas y eficaces en los tratamientos antibióticos clínicos y veterinarios. Por tal motivo, el desarrollo de protocolos específicos de detección por métodos bioquímicos y el análisis de éstos es un procedimiento de elevada importancia, teniendo en cuenta que el número de resistencias que se producen en estos casos va en aumento con el paso del tiempo.

Los principales objetivos se resumen a continuación:

- Estudio de los patrones de resistencias a antibióticos presentes en cepas de *Escherichia coli* procedentes de dos orígenes: heces de gallinas y calzas, mediante la técnica de Kirby Bauer o difusión en disco-placa. Determinando cuales son los antibióticos para los que aparecen mayor resistencia, si existen aislados multirresistentes y cuáles son los antibióticos que conforman éstas, así como estudiar los patrones de resistencia que más se repiten a lo largo de las cepas. Además de comparar los resultados obtenidos en los dos orígenes de las muestras.
- Puesta a punto de las condiciones de PCR para la detección de diversos genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos y quinolonas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces y calzas. Analizando la prevalencia de cada uno de ellos en los aislados según el origen de las muestras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Origen de las muestras

Las cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio fueron aisladas de gallinas reproductoras procedentes de una explotación comercial del este de España. Se tomaron muestras tanto de heces como de las calzas utilizadas por los operarios en contacto con las gallinas. En un análisis ordinario para la detección de patógenos en la explotación se recogían muestras procedentes de heces y de calzas, que contenían tanto restos de heces como de plumas paja, etc. con la intención de observar las diferencias entre ambas. Por lo que para llevar a cabo el estudio se aislaron cepas de las dos procedencias. Las muestras se recogieron en botes estériles manteniéndose a 4°C hasta su procesado.

3.2. Selección de cepas de *E. coli*

El total de cepas aisladas de *E. coli* fueron 191, de los cuales 99 procedieron de calzas y 92 de heces. Para el procesado de las muestras de heces se pesaron 25 g y se resuspendieron en una bolsa stomacher con 225 ml de agua de peptona (APT) (Buffered peptone water (ISO), Scharlau, Barcelona, Spain); y en el caso de las calzas se añadieron directamente en las bolsas que las contenían 300 ml de APT (o hasta sumergirlas completamente). Posteriormente se homogeneizaron en Stomacher (BAGPAGE, interscience BagSystem). Para la dilución inicial se tomaron 10 ml de APT con la muestra resuspendida, y a partir de ésta se pasó 0,1 ml a 9 ml de agua destilada estéril. Y así se procedió para las siguientes diluciones. Una vez obtenidas las diluciones se tomó 0,1 ml y se sembró en superficie por duplicado utilizando medio agar cromogénico para coliformes (CHROMOGENIC COLIFORMS AGAR BASE, Scharlau, Microinstant®, Barcelona, Spain). Las placas se incubaron a 37±1°C durante 24 horas facilitando de esta forma el crecimiento único de *E. coli*.

Transcurrido este tiempo se observaron 3 tipos distintos de colonias: blancas/amarillas, correspondientes a bacilos gram-negativos; rosas/moradas, características de bacterias coliformes distintas a *E. coli*; y azul oscuro/violetas, características de *E. coli*. Según el número de muestreo y procedencia del mismo se seleccionó un número distinto de colonias características de *E. coli* del medio cromogénico para coliformes, tal y como se describe en la Tabla 1, y se realizó un pase en triple estría a placas de PCA (Plate Count Agar, Scharlau, Barcelona, Spain) dejándolas incubar a 37±1°C durante 24h.

Finalmente se procedió a la identificación de *E. coli*. Para ello se utiliza la confirmación bioquímica mediante la prueba del Indol. Esta prueba consiste en resuspender una colonia

aislada, procedente de la placa de PCA, en 10 ml de caldo de triptófano (Merck Microbiology DEV Tryptophan Broth) dejando incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Posteriormente se adicionan dos gotas de reactivo de Kovacs de forma que aquellas en las que en pocos segundos se forma un anillo que vira a un color rojo se considera la producción de indol positiva y con ello la presencia de *E. coli* queda confirmada. Así, aquellas cepas que resultaron positivas fueron las que se seleccionaron para el estudio.

En aquellas colonias que el Indol dio negativo, se procedió al aislamiento de otra colonia sospechosa de ser *E. coli* desde la placa de medio cromogénico para coliformes y se repitió el mismo proceso.

3.3. Estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos en *E. coli*

Para llevar a cabo el estudio de susceptibilidad a antimicrobianos se utilizó el método del antibiograma disco-placa del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014). Se fundamenta en la difusión radial del antimicrobiano presente a una concentración dada a través del agar, formándose así un gradiente de concentración en el que, transcurrido el periodo de incubación (24h), se observa un halo de inhibición del crecimiento de la bacteria.

Los antibióticos en disco testados elegidos en base a la EFSA (Europea Food Safety Authority, 2008) fueron: ácido nalidíxico NA 30 μg , ampicilina AMP 10 μg , cefotaxima CTX 30 μg , ceftazidima CAZ 30 μg , ciprofloxacino CIP 5 μg , cloranfenicol C 30 μg , estreptomina S 10 μg , gentamicina CN 10 μg y tetraciclina TE 30 μg (OXOID antimicrobial susceptibility test disc). El procedimiento consistió en: a partir de las placas de PCA indol-positivas para *E. coli*, coger varias colonias y resuspenderlas en un tubo con suero salino al 85% (Scharlau Sodium chloride extra pure) a una concentración de 0,5 en la escala de McFarland. A partir de dicho inóculo, utilizando un escobillón, se extendió tal y como indica el método disco-placa, en medio MH agar (Muller-Hinton Agar, Scharlau, Barcelona, Spain), consiguiendo que la cepa quedase extendida por toda la placa uniformemente. Por último, se colocaron los discos con los distintos antibióticos mediante un dispensador (OXOID antimicrobial susceptibility testing disc dispenser) y las placas se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

Tras las 24 horas de incubación se midieron, en mm, los halos de inhibición de cada disco. Para cada antimicrobiano existen unos diámetros de inhibición estandarizados (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014), expresados en mm. La lectura de los halos de inhibición se interpreta como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI, en referencia comparativa con una cepa control de calidad, en este caso se utilizó *E. coli* ATCC 25922 como cepa control. El intervalo de diámetro de los halos para

considerarse como S, I o R para cada antibiótico medidos en mm son: CN (R: ≤ 12 mm; S: ≥ 15 mm; I: 13-14mm), AMP (R: ≤ 13 mm; S: ≥ 17 mm; I: 14-16mm), C (R: ≤ 12 mm; S: ≥ 18 mm; I: 13-17mm), CIP (R: ≤ 15 mm; S: ≥ 21 mm; I: 16-20mm), TE (R: ≤ 14 mm; S: ≥ 19 mm; I: 15-18mm), NA (R: ≤ 13 mm; S: 19mm; I: 14-18mm), S (R: ≤ 8 mm; S: ≥ 10 ; I: 7-9mm), CAZ (R: ≤ 15 mm; S: ≥ 21 mm; I: 18-20mm) y CTX (R: ≤ 22 mm; S: ≥ 26 mm; I: 23-25mm).

3.4. Conservación de cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* aisladas de los distintos muestreos se congelaron para su conservación y utilización en estudios posteriores utilizando crioviales (Pro-lab Diagnostics Microbank™) a una temperatura de -20°C , a partir de pases de un día de incubación a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en placas PCA.

3.5. Extracción del ADN de *E. coli*

La extracción de material genético de las cepas se llevó a cabo mediante un procedimiento basado en el "método de Holmes y Quigley" o "boiling" (Holmes y Quigley, 1981), que consiste en el hervido de pequeños volúmenes de muestra a unos $95-100^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, sin la necesidad de una purificación posterior. Para ello se resuspendieron en unos 100-150 μl de tampón TE 1X (TE buffer (1X), AppliChem Panreac) un par de colonias crecidas a 37°C durante 24 horas en medio PCA, se hirvió durante 10 minutos a 95°C y a continuación se centrifugó durante 8 minutos a 13.000 r.p.m. Así se recupera el sobrenadante que va a contener el ADN pasándolo a un nuevo eppendorf y se desecha el pellet. La calidad del material genético obtenido por este método es inferior al que se consigue con un kit comercial, pero es un procedimiento rápido y de bajo coste con el que se puede obtener suficiente muestra de ADN y de calidad óptima para el objetivo de este estudio.

3.6. Amplificación del ADN de *E. coli* mediante PCR

Se realizaron diversas PCR para amplificar diferentes genes de resistencia a antibióticos. Por una parte, se estudió la resistencia a β -lactámicos, para lo cual se analizó la presencia o ausencia de los genes: *SHV*, *TEM* y *CMY-2*; también se estudió la resistencia a tetraciclinas, donde los genes seleccionados fueron: *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*; macrólidos, estudiando el gen *ermB*; y finalmente resistencia a quinolonas, utilizando el gen *qnrS*. Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

En todos los casos el mix de la PCR se elaboró para un volumen final de 25 μl , donde 2,5 μl eran de ADN. Se incluyó un control negativo, para el cual en vez de utilizar ADN se

añadieron 2,5µl de agua miliQ estéril; y un control positivo, proveniente de estudios anteriores, con ADN que contuviese el gen/es de estudio. Los reactivos utilizados fueron agua miliQ, tampón (Reaction Buffer, BIOTAQ™ DNA Polymerase, Biorline), MgCl₂ (MgCl₂ Solution, BIOTAQ™ DNA Polymerase, Biorline, Barcelona, Spain), dNTPs (dNTP Mix, BIOTAQ™ DNA Polymerase, Biorline, Barcelona, Spain) y Taq-plimerasa (BIOTAQ DNA Polymerase, BIOTAQ™ DNA Polymerase, Biorline, Barcelona, Spain). Las concentraciones de los distintos reactivos y las secuencias de primers y tamaño de amplicón se describen en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Concentraciones de los distintos reactivos utilizados en las PCR. mM: milimolar; dNTPs: desoxinucleótidos.

Reactivos	Concentraciones
Agua miliQ	-
Buffer	1X
MgCl ₂	2,5 mM
Primers	Mirar PCR
dNTPs	0,2 mM/cada dNTP
Taq-Polimerasa	1,25 unidades

Tabla 2. Secuencia y tamaño (bp) de los primers de desoxinucleótidos utilizados para la amplificación de los distintos genes. bp: pares de bases; f: forward; r:reverse; μ M: micromolar.

PCR	Gen	Secuencia (5'-3')	Amplificación	Concentración	Referencia
			(bp)	final de primer(μ M)	
1	SHVf	AGGATTGACTGCCTTTTTG	393	0,4	Kozak et al., 2009
	SHVr	ATTTGCTGATTCGCTCG		0,4	
1	TEMf	TTAACTGGCGAACTACTTAC	247	0,2	Kozak et al., 2009
	TEMr	GTCTATTTTCGTTTCATCCATA		0,2	
1	CMY-2f	GACAGCCTCTTCTCCACA	100	0,2	Kozak et al., 2009
	CMY-2r	TGGACACGAAGGCTACGTA		0,2	
2	Tet(A)f	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	502	0,1	Lanz et al., 2003
	Tet(a)r	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA		0,1	
2	Tet(B)f	CGCCAGTGCTGTTGTTGTC	173	0,2	Lanz et al., 2003
	Tet(B)r	CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG		0,2	
2	Tet(C)f	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT	888	0,5	Lanz et al., 2003
	Tet(C)r	GCCGGAAGCGAGAAGAATCA		0,5	
3	ermBf	GATACCGTTTACGAAATTGG	364	0,5	Chen et al., 2007
	ermBr	GAATCGAGACTTGAGTGTGC		0,5	
4	qnrSf	GACGTGCTAACTTGCGTGAT	120	0,2	Marti y Balcazar, 2011
	qnrSr	TGGCATTGTTGGAAACTTG		0,2	

PCR múltiplex 1: ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 15 min; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 72°C durante 1 min; y etapa final de 72°C durante 10 min. **PCR múltiplex 2:** 94°C 15 min; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 63°C y 72°C 1 min; 72°C 10 minutos. **PCR 3:** 95°C durante 3 min; 40 ciclos de 15 s a 95°C, 20 s a 58°C y 1 min a 72°C; 72°C 10 min. **PCR 4:** 95°C 3 min; 40 ciclos de 15 s a 95°C, 20 s a 62°C, 72°C 1 minuto; 72°C 10 min.

3.7. Comprobación de presencia/ausencia de amplificado por electroforesis

Tras cada una de las reacciones de PCR, se llevó a cabo la detección del producto amplificado mediante gel de electroforesis de agarosa. De esta forma aquellas cepas que contienen el gen de resistencia al antibiótico a estudio en cada caso, habrán amplificado por PCR y por tanto podremos observar banda mediante electroforesis, en el tamaño correspondiente.

Se visualizó la presencia de banda gracias al empleo de Red Safe (iNtRON biotechnology, EEUU) al 5%, un agente intercalante de menor toxicidad que el bromuro de etidio y, por tanto, más seguro que éste. Se realizó la mezcla de 5 μ L de muestra procedente de

la PCR con 2 μ L de tampón de carga (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific) para la carga del gel. El tamaño de los amplicones fue confirmado mediante comparación con el marcador molecular GeneRuler 100-bp DNA Ladder Plus (MBI, Fermentas, Burlington).

Las muestras se corrieron en un del gel de agarosa de 1,2% de concentración (Agarose, Roche) en tampón TAE 1x (AppliChem Panreac TAE buffer (50X)), durante unos 50 minutos y a un voltaje de 100V. Los geles se visualizaron mediante un transiluminador Vilber Lourmat (09 200272) con luz UV.

3.8. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se empleó el programa informático "Statgraphics Centurion XVI". Se realizó un análisis de los datos empleando un análisis de correlación mediante una tabla de contingencia, específicamente una tabulación cruzada con el fin de analizar la relación entre dos o más variables. Se consideró como estadísticamente significativos aquellos análisis con un p-valor inferior a 0,05.

4. Resultados

4.1 Estudio de la prevalencia de resistencia a los distintos antibióticos

De las 191 cepas aisladas de gallinas reproductoras 163 mostraron resistencia a algún antibiótico (84,34%) dentro de las cuales 36 (18,85% del total de aislados), resultaron ser multirresistentes. El número de cepas, totales y en función de su origen, resistentes a cada uno de los antibióticos se muestran en la Tabla 3. Principalmente las resistencias se centraron en 3 antibióticos, donde la mayor tasa se encontró en la ampicilina (63,35%), seguida del ácido nalidíxico (49,22%) y de la tetraciclina (36,13%). No se encontró ninguna cepa resistente a ceftazidima y cefotaxima.

Tabla 3. Número de cepas y porcentaje (%) de resistentes a los distintos antibióticos según origen. En rojo los porcentajes correspondientes a los antibióticos para los que se observó mayor resistencia. AMP: ampicilina, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacino, C: cloranfenicol, CTX: cefotaxima, N: gentamicina, NA: ácido nalidíxico, S: estreptomina, TE: tetraciclina, %: porcentaje de cepas resistentes.

Antibióticos	Calzas	Heces	Total(calzas y heces)	%
NA	63	31	94	49,22
	67,02%	32,98%	100,00%	
AMP	73	48	121	63,35
	60,33%	39,67%	100,00%	
C	13	2	15	7,85
	86,67%	13,33%	100,00%	
CIP	2	8	10	5,24
	20,00%	80,00%	100,00%	
TE	26	43	69	36,13
	37,68%	62,32%	100,00%	
CN	1	2	3	1,57
	33,33%	66,67%	100,00%	
CAZ	0	0	0	0
	0,00%	0,00%	0,00%	
CTX	0	0	0	0
	0,00%	0,00%	0,00%	
S	2	3	5	2,62
	40,00%	60,00%	100,00%	

Los resultados obtenidos se compararon con los datos ofrecidos por el informe llevado a cabo por la EFSA y ECDC: “The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014”. En éste se observa que la resistencia tanto a ampicilina como a tetraciclinas fue muy alta en la mayoría de los países con una resistencia general del 58,7% y del 50,1%, respectivamente. Además en cuanto a la ocurrencia de estos antibióticos en España el porcentaje de resistencia para ampicilina y

tetraciclinas fueron del 72,4% y 60,6% respectivamente. Si se comparan estos datos con los obtenidos en este estudio, se observa una gran similitud en lo que se refiere a la resistencia frente a ampicilina: 63,35%; por su parte en el caso de las tetraciclinas el porcentaje de resistencia fue bastante menor: 36,13%, siendo más similar si nos fijamos únicamente en aquellas cepas aisladas de heces, donde 43 de 99 (43,43%) mostraron resistencia a tetraciclinas. En cualquier caso, en ambos estudios existe gran semejanza en cuanto a los resultados, situándose la ampicilina, ácido nalidíxico y tetraciclina como algunos de los antibióticos para los que se encontraron mayor número de cepas resistentes.

Para el caso del cloranfenicol el informe llevado a cabo por la EFSA mostró que, la resistencia frente a éste era muy variada, siendo la media entre países de un 21,6%, muy similar al porcentaje obtenido en España, 18,8%. En este trabajo se obtuvo un 7,85% de resistencia frente a cloranfenicol, pero dado que no existe una tendencia general entre los países se puede considerar un valor dentro de la normalidad.

La resistencia a la gentamicina aunque se notificó a niveles bajos en general, con una media de 11,6, en España el porcentaje fue más del doble, 32,9% según el informe de la EFSA. En este estudio la resistencia a gentamicina fue muy baja, sólo del 1,57%.

En cuanto al grupo de las quinolonas, la ciprofloxacina y el ácido nalidíxico mostraron tasas de prevalencia similares, con una media de 65,7% y 62,6% respectivamente, aumentando en el caso de España con un 85,3% y un 84,1%, respectivamente. Los resultados obtenidos en el estudio fueron dispares al informe, ya que el porcentaje de resistencia a ciprofloxacino fue de solamente un 5,24%, y en el caso del ácido nalidíxico aunque más similar, con un 49,22%, también se situó por debajo.

Además, no se encontró en el estudio ninguna cepa que mostrase resistencia para las cefalosporinas ceftazidima y cefotaxima, y aunque según el informe de la EFSA el porcentaje notificado de resistencia para ambos antibióticos fue de un 14,7%, la tasa general es bastante moderada, por lo que no encontrar cepas resistentes a estos antibióticos resulta bastante probable.

Por último, también se observaron diferencias entre los distintos orígenes. Para la mayoría de antibióticos se encontraron mayor número de cepas resistentes procedentes de calzas, exceptuando el caso del ciprofloxacino y tetraciclina, donde el número de cepas resistentes fue de 8 cuando se trata de heces frente a 2 procedentes de calzas para el ciprofloxacino; mientras que 43 cepas procedentes de heces fueron resistentes a tetraciclina, frente a las 26 procedentes de calzas.

Se realizó una prueba de independencia comparando el origen de la cepa frente a la susceptibilidad y el valor-P fue de 0,0625, por lo que las diferencias en la susceptibilidad a antibióticos observadas en función del origen no resultaron ser significativas.

4.2 Multirresistencia y prevalencia de patrones de resistencia

La multirresistencia de 36 de las 191 cepas aisladas de *E. coli* constituye el 18,85% del total de aislados, entendiéndose como multirresistentes aquellas cepas resistentes para 3 o más grupos distintos de antibióticos, de acuerdo con las recomendaciones de Magiorakos et al. (2012). La tabla 4 muestra los patrones de antibióticos que constituyeron multirresistencia y el porcentaje de cepas tanto dependiendo del origen, como en la totalidad del muestreo obtenidas. Se encontraron 9 patrones de resistencia a antibióticos diferentes en este estudio, donde destacaron NA-AMP-C y NA-AMP-TE ambos patrones con un porcentaje de 18,85% frente al total de cepas aisladas, seguidos de NA-AMP-CIP-TE con un 4,19%. El resto de patrones mostraron una tasa inferior al 1% de prevalencia.

Tabla 4. Patrones de multirresistencia y prevalencia en los aislados según el origen. En rojo los porcentajes (%) correspondientes a los patrones más significativos. AMP: ampicilina, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacino, C: cloranfenicol, CTX: cefotaxima, N: gentamicina, NA: ácido nalidíxico, S: estreptomycin, TE: tetraciclina, %: porcentaje de cepas multirresistentes.

Patrones	Calzas	Heces	Total(calzas y heces)
AMP-TE-S	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
NA-AMP-C	10	0	10
	5,24%	0,00%	5,24%
NA-AMP-C-CIP-TE	1	0	1
	0,52%	0,00%	0,52%
NA-AMP-C-TE	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
NA-AMP-CIP-TE	1	7	8
	0,52%	3,66%	4,19%
NA-AMP-CN	1	0	1
	0,52%	0,00%	0,52%
NA-AMP-TE	2	8	10
	1,05%	4,19%	5,24%
NA-AMP-TE-S	2	1	3
	1,05%	0,52%	1,57%
NA-CIP-TE-S	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
TOTAL	17	19	36
	47,22	52,78	100
		% vs. Resistentes	22,09
		%vs. a total	18,85

Se compararon estos resultados con los ofrecidos por el informe publicado por la EFSA en 2016, anteriormente comentado. En éste todos los países registraron aislados multirresistentes aunque la proporción varió bastante entre ellos, y además también en todos se encontró alguna cepa resistente hasta a 5 antibióticos distintos, apareciendo también algún país que reportó aislados resistentes hasta a 8 o 9 sustancias distintas. En este estudio aunque solo se trata de 1 cepa, también se encontró multirresistencia a 5 antibióticos distintos.

El informe señaló que la resistencia a ampicilina, ciprofloxacino/ácido nalidíxico, sulfametoxazol, tetraciclinas y trimetoprim aparecía como un patrón central en el 41,2% de todos los aislamientos de *E. coli* de broilers, situándose como el patrón predominante de multirresistencia (9,6%). En el presente estudio aunque no todos estos antibióticos fueron analizados, se observó como en los 3 patrones de multirresistencia con mayor prevalencia aparecía el ácido nalidíxico junto con la ampicilina y en 2 de estos 3 también resistencia a tetraciclinas, tal y como ocurre en el informe de la EFSA. Además también se encontró similitud en la resistencia a cefotaxima y ceftazidima, los cuales no estaban presentes en ningún patrón el cual tuviese una frecuencia mayor al 1% en el informe de la EFSA, y en el presente estudio como se ha comentado no se encontraron cepas resistentes a estos.

El número de cepas multirresistentes según la procedencia resultó muy similar, donde para las calzas el patrón que más se repitió fue el de NA-AMP-C, mientras que en heces NA-AMP-TE y NA-AMP-CIP-TE tuvieron mayor importancia.

El número de cepas y porcentaje frente al total de aislados para los distintos patrones según el origen de las muestras también se estudiaron y los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 5. El patrón que más se repitió fue el conformado por ácido nalidíxico y ampicilina (27,75% del total de aislados), el cual apareció en 53 cepas. Seguidamente se situó el de tetraciclina, 32 cepas mostraron resistencia únicamente a este antibiótico (16,75%), y por último destacaron las cepas resistentes a únicamente ampicilina, siendo éstas 24 (12,57%).

Tabla 5. Prevalencia de los distintos patrones de resistencia en los aislados según el origen. En rojo el número de cepas y porcentaje total de los patrones de mayor relevancia. AMP: ampicilina, CAZ: ceftazimida, CIP: ciprofloxacino, C: cloranfenicol, CTX: cefotaxima, N: gentamicina, NA: ácido nalidíxico, S: estreptomicina, TE: tetraciclina.

Patrones	Calzas	Heces	Total (calzas y heces)
AMP	6	18	24
	3,14%	9,42%	12,57%
AMP,C	1	0	1
	0,52%	0,00%	0,52%
AMP,CN	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
AMP,TE	4	3	7
	2,09%	1,57%	3,66%
AMP,TE,S	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
C,TE	1	1	2
	0,52%	0,52%	1,05%
CN	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
NA	0	3	3
	0,00%	1,57%	1,57%
NA,AMP	45	8	53
	23,56%	4,19%	27,75%
NA,AMP,C	10	0	10
	5,24%	0,00%	5,24%
NA,AMP,C,CIP,TE	1	0	1
	0,52%	0,00%	0,52%
NA,AMP,C,TE	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
NA,AMP,CIP,TE	1	7	8
	0,52%	3,66%	4,19%
NA,AMP,CN	1	0	1
	0,52%	0,00%	0,52%
NA,AMP,TE	2	8	10
	1,05%	4,19%	5,24%
NA,AMP,TE,S	2	1	3
	1,05%	0,52%	1,57%
NA,CIP,TE,S	0	1	1
	0,00%	0,52%	0,52%
NA,TE	1	2	3
	0,52%	1,05%	1,57%
TE	14	18	32
	7,33%	9,42%	16,75%
Sensible	10	18	28
	5,24%	9,42%	14,66%
Resistentes	89	74	163
	46,60	38,74	85,34
Total por Columna	99	92	191
	51,83%	48,17%	100,00%

El informe de la EFSA encontró que, la mayoría de los aislamientos resistentes a ciprofloxacino también eran resistentes al ácido nalidíxico. En el estudio 10 de los aislados (19,1%) fueron resistentes a ambos antibióticos, aunque no de forma aislada, sino conjuntamente con otros antibióticos. También reporta una serie de aislamientos (59,5%) resistentes a ampicilina, sulfametoxazol y tetraciclinas, con o sin resistencias adicionales. En este estudio 31 aislados eran conjuntamente, junto con otros antibióticos, resistentes a ampicilina y tetraciclina, por lo que ambos informes mostraron resultados similares.

De forma general, en el informe de la EFSA se observó una variedad de patrones de resistencia en aislamientos co-resistentes, presentándose cada patrón a una frecuencia baja. En este estudio aunque algunos de los 3 patrones de mayor prevalencia mostraban una tasa alta, la mayoría de los patrones, como se ha comentado, se encontraron en una proporción inferior al 1%.

Las diferencias entre heces y calzas aunque en el total de resistentes no variaron extremadamente, encontrándose 89 cepas procedentes de calzas resistentes frente a 74 en heces, sí aparecieron más diferencias en cuanto a cual/es eran los patrones de resistencia más comunes. En el caso de las calzas 45 de las 89 cepas eran resistentes a nalidíxico y ampicilina, constituyendo un 23,57%, mientras que en heces, el patrón más común encontrado fue el constituido únicamente por ampicilina o únicamente tetraciclina, en ambos casos 18 cepas de 74 fueron resistentes, constituyendo un 9,42% del total para cada uno de ellos.

4.3. Detección de genes de resistencia

La detección de distintos genes de resistencia a antibióticos se realizó mediante PCR con la posterior visualización de los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa. Dentro del grupo de antibióticos β -lactámicos se estudiaron los genes: *TEM*, *SHV*, *CMY-2*; de tetraciclinas: *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*; para macrólidos el gen *ermB*; y *qnrS* de quinolonas.

4.3.1 Detección de β -lactamasas de amplio espectro de tipo *TEM*, *SHV*, *CMY-2*

Para el estudio de la resistencia a antibióticos β -lactámicos se estudiaron 3 genes distintos: *TEM*, *SHV* y *CMY-2*. En la figura 1 se pueden observar los resultados en varias muestras tras la amplificación de los distintos genes mediante PCR múltiple en gel de agarosa. Los amplicones obtenidos fueron: con 247bp correspondiente al gen *TEM*; con 393bp el correspondiente al gen *SHV*; y con 1000bp, aunque no se encontró amplificación en ninguna de las muestras de la figura, donde se debería encontrar el del gen *CMY-2*.



Figura 1. Productos amplificados por PCR múltiplex en gel de agarosa para los genes que codifican para β -lactamasas *TEM*, *SHV* y *CMY-2* en 19 muestras de *E. coli*. 1: Marcador molecular de 100bp, 2: Aislado que contiene los genes *SHV* y *TEM*, 4-6, 8-20: Amplificados de cepas de *E. coli* con presencia del gen *TEM*, 3 y 7: Muestras con ausencia de los tres genes. bp: pares de bases.

Los resultados obtenidos para la amplificación de los 3 genes en los aislados según su origen se muestran en la figura 2. Para el gen *TEM*, se observó que de las 180 cepas a estudio, 143 fueron positivas, lo que supuso el 79,44%, de éstas 87 pertenecían a cepas aisladas de calzas mientras que, 56 tenían su origen en heces. Por otro lado para el gen *SHV*, 38 de las 180 cepas resultaron positivas, lo que supuso el 21,11% del total, dentro de las cuales encontramos que 37 pertenecían a calzas, mientras que solo 1 de los aislados de heces fue positivo para este gen. Por último si analizamos el gen *CMY-2*, éste contó con solamente 21 cepas positivas (11,67%) de las cuales 18 pertenecían a calzas, y solo 3 a heces.

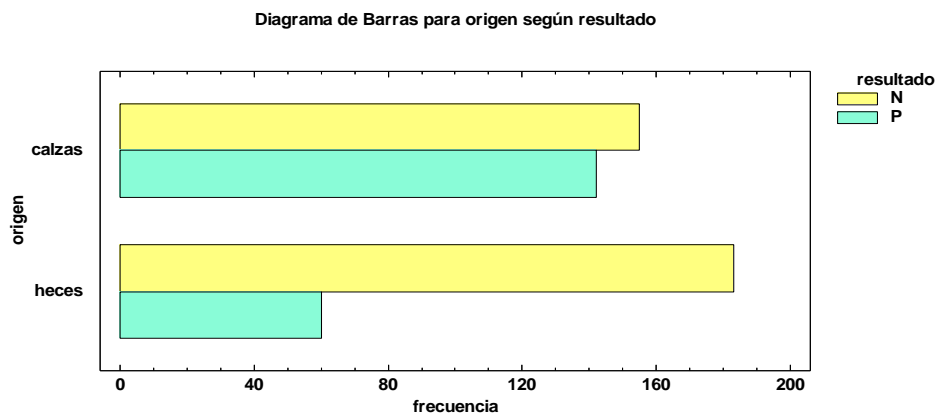


Figura 2. Frecuencia de los genes *TEM*, *SHV* y *CMY-2* según origen. N: negativo (ausencia de banda); P: positivo (presencia de banda).

La prueba de hipótesis realizada sobre los resultados mostró un p-valor menor a 0,05, con lo cual se probó la validez de los datos obtenidos tras el análisis, afirmando que las diferencias entre calzas y heces en cuanto a la presencia o ausencia de los genes de resistencia a β -lactámicos; *TEM*, *SHV* y *CMY-2* son significativas.

4.3.2 Detección de genes de resistencia a tetraciclinas: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*

Se estudió por otra parte la resistencia a tetraciclinas, para lo cual se comprobó la presencia/ausencia de 3 genes que codifican resistencia a éstas: *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*. En la figura 3 se observan las distintas bandas en gel de agarosa correspondientes a los amplicones productos de la PCR múltiplex pertenecientes a los 3 genes estudiados. A 888bp, aunque no vemos amplificado en ninguna de las muestras de la imagen, se encontraría la banda correspondiente a *tet(C)*; a 502bp la banda del gen *tet(A)*; y a 173bp el gen *tet(B)*.



Figura 3. Productos amplificados por PCR múltiplex en gel de agarosa para los genes de resistencia a tetraciclinas: *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)* en 19 muestras de *E. coli*. **1:** Marcador molecular de 100bp, **2, 5, 7-12, 17-19:** Amplificados de cepas de *E. coli* positivas para el gen *tet(A)*, **14 y 20:** Aislados de *E. coli* positivos para el gen *tet(B)*. bp: pares de bases.

La frecuencia de los 3 genes de resistencia a tetraciclinas según el origen en los aislados de *E. coli* estudiados se muestran en la tabla 8. Para el gen *tet(A)*, de los 180 aislados 73 fueron positivos, constituyendo el 40,56%, de los cuales 26 procedían de calzas y 47 pertenecían a cepas procedentes de heces; en el caso del gen *tet(B)*, solo 8 de las 180 cepas fueron positivas, lo que supuso el 4,44%, siendo las 8 aisladas de heces; para el gen *tet(C)* se encontraron 4 cepas positivas (2,22%), siendo la mitad procedentes de heces y la otra mitad de calzas.

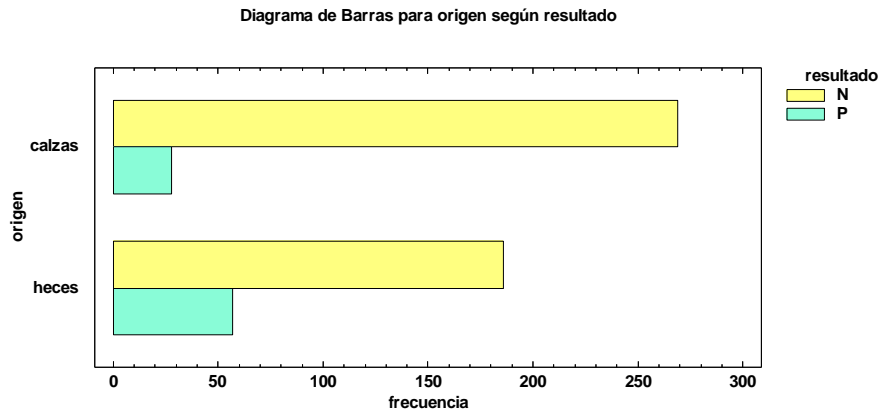


Figura 4. Frecuencia de los genes: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* según origen. N: negativo (ausencia de banda); P: positivo (presencia de banda).

EL análisis estadístico resultó en un valor-P menor a 0,05 por lo que el origen de las muestras y la presencia de los genes de resistencia a tetraciclinas: *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)* están relacionados y las diferencias son significativas.

4.3.3 Detección de genes de resistencia a macrólidos: *ermB*.

Con el objetivo de estudiar la resistencia a macrólidos, se tomó un gen que codifica resistencia a eritromicina, *ermB*. La figura 3 muestra el gel de agarosa con los resultados de la PCR llevada a cabo para amplificar este gen en distintas muestras. El amplicón correspondiente a *ermB* fue de 364bp.



Figura 5. Gel de agarosa producto de la amplificación mediante PCR del gen *ermB* en aislados de *E. coli*. 1: Marcador molecular de 100bp, 2-20: Amplificados de cepas de *E. coli*. bp: pares de bases.

La frecuencia con la que el gen *ermB* aparece en los aislados en función de su origen queda reflejada en la figura 6. El 18,89%, es decir 34 de los 180 aislados, eran positivos para este gen, dentro de los cuales 23 pertenecían a cepas aisladas de calzas y 11 tenían su origen en muestras de heces.

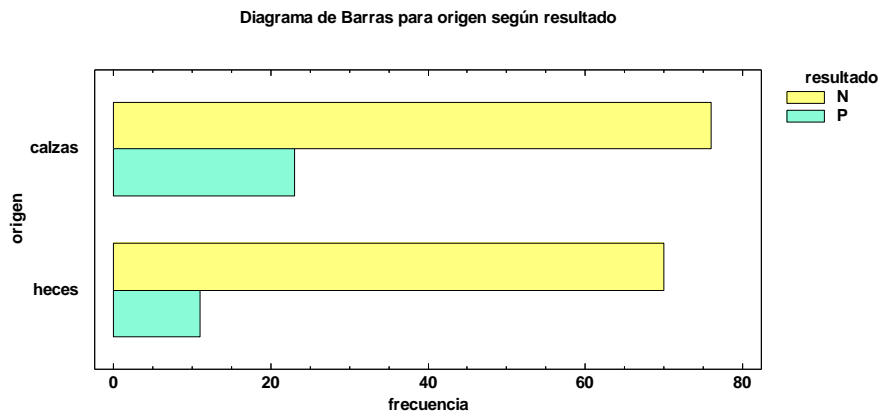


Figura 6. Frecuencia del gen *ermB* según origen. N: negativo (ausencia de banda); P: positivo (presencia de banda).

Las diferencias numéricas observadas no son estadísticamente significativas, con un valor-P de 0,0998, por lo tanto, el origen de las cepas no tuvo influencia sobre la presencia del gen de resistencia a macrólidos *ermB*, ambos son independientes entre sí.

4.3.4 Detección de genes de resistencia a quinolonas: *qnrS*.

Por último, también se estudió la resistencia a quinolonas, para lo cual se analizó la presencia/ausencia del gen *qnrS*. En la figura 4 se pueden observar los productos de la amplificación por PCR de este gen para distintos aislados. El amplicón para *qnrS* fue de 120bp.



Figura 7. Gel de agarosa producto de la amplificación mediante PCR del gen *qnrS*. 1: Marcador molecular 100bp. 2, 3, 5, 7-16: Amplificados de muestras de *E. coli* positivas para el gen *qnrS*. 4, 6: Amplificados de cepas de *E. coli* con ausencia del gen *qnrS*. bp: pares de bases.

A continuación, en la figura 8 queda reflejada la prevalencia del gen *qnrS* en los aislados dependiendo de su origen. Un total de 116 de las 180 cepas estudiadas fueron positivas para el gen *qnrS*, lo que supuso el 64,44%. Dentro de los positivos 70 pertenecían a muestras obtenidas a partir de calzas y los 46 restantes tuvieron su origen en heces.

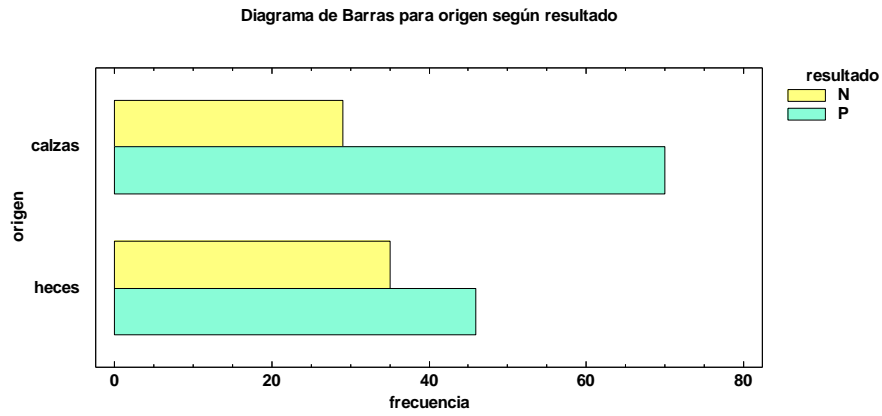


Figura 8. Frecuencia del gen *qnrS* según origen. N: negativo (ausencia de banda); P: positivo (presencia de banda).

El análisis estadístico de los datos reveló un valor-P de 0,0523, por lo que el origen de las muestras y la presencia o ausencia del gen de resistencia a quinolonas *qnrS* son independientes entre sí y las diferencias observadas no son significativas.

5. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos que se produce en animales puede propagarse a las personas a través de los alimentos, por el ambiente, así como por contacto directo con los animales. *E. coli* es un ejemplo de bacteria capaz albergar genes de resistencia, que pueden ser transferidos entre especies bacterianas mediante transferencia horizontal, incluyendo organismos capaces de causar enfermedades en humanos y animales (EFSA, 2008). Esto pone de manifiesto que el estudio de las bacterias comensales de los animales es fundamental para comprender el desarrollo y la difusión de la resistencia a antibióticos tanto en animales como en humanos. Lo que permite conocer cuáles son aquellos antibióticos para los cuales existen más resistencias e identificar patrones emergentes o específicos de resistencia; además de proporcionar información sobre el depósito de genes de resistencia (Szmolka y Nagy, 2013).

Algunas de las características las cuales hacen de *E. coli* una bacteria ampliamente utilizada como indicador para estudiar resistencias a antibióticos y los genes que desencadenan dichas resistencias son: la capacidad para persistir en el medio ambiente durante un período considerable, al aislarse de heces generalmente, son relevantes para la medicina humana y además la mayoría de los fenotipos de resistencias presentes en las poblaciones animales se encuentran en esta especie. *E. coli*, a su vez, como es de esperar, constituye un reservorio de genes de resistencia, que pueden ser transferidos a bacterias patógenas y otros comensales (Saenz et al., 2004). Por todo ello es comúnmente utilizado como representante de gram-negativos.

En este estudio se aislaron 191 cepas de *E. coli* con el objetivo de estudiar la susceptibilidad a algunos de los antimicrobianos más utilizados (EFSA, 2008) y la presencia de distintos genes que proporcionan resistencia a antibióticos. Los resultados mostraron que 163 de los aislados contaban con resistencia para alguno de los antibióticos analizados, lo que supone el 85,34% de aislados, tal y como se observó en otros estudios (Martins da Costa et al., 2011; Hanon, et al., 2015). Estos resultados concuerdan además con el informe de la EFSA (2014) donde más del 90% de los *E. coli* estudiados eran resistentes a al menos un antibiótico.

Los antibióticos para los cuales aparecieron mayor porcentaje de cepas resistentes fueron: ampicilina, ácido nalidíxico y tetraciclina. Los resultados son comparables con los de otros estudios, donde la resistencia a estos antibióticos contaba con una tasa superior al 50% (Hanon, et al., 2015). Estos datos ponen de manifiesto que la aparición de resistencias en *E. coli* es algo que ocurre de forma habitual. Existen varias explicaciones para el aumento de la

resistencia a antibióticos que se está teniendo en la actualidad. El más obvio, y el cual se ha comentado ya varias veces a lo largo del trabajo, es la presión selectiva que ejercen los antimicrobianos sobre las bacterias, debido al uso excesivo que se hace de los mismos. De hecho las asociaciones entre la exposición a antimicrobianos veterinarios y mayor prevalencia de resistencia en *E. coli* de animales ya se han demostrado en diversos estudios (Chantziaras et al., 2014; García-Migura, 2014; Simoneit et al., 2014).

Además se observó resistencia al cloranfenicol (7,85%) a pesar de que este antimicrobiano quedó prohibido para uso veterinario en Europa desde 1997 (Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo y las enmiendas 1570/98 y 508/1999). La explicación más probable para ello es la co-selección, que selecciona cepas bacterianas resistentes a varios antimicrobianos debido a la agrupación de varios genes de resistencia en el mismo locus genético en el genoma bacteriano. Este fenómeno constituye otro de los factores que provocan el aumento de resistencias a antibióticos el cual viene dado en muchos casos por el uso inconexo de antibióticos (Bager et al., 1999; Schwarz, 2004) lo cual supone que se adquiera conjuntamente resistencia a varios antibióticos al mismo tiempo.

La co-selección es por tanto lo que explica tanto la presencia de cepas multirresistentes, como la presencia de resistencias a varios tipos de antibióticos para los que los mecanismos de resistencias son diferentes, mediante la selección de cepas con elementos genéticos móviles que transportan resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Se sabe que los plásmidos pueden conferir resistencia a β -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, macrólidos y quinolonas (Carattoli, 2009). Por lo tanto, la ampicilina junto con el ácido nalidíxico y la tetraciclina, debido al gran uso que tienen tanto en humanos como en medicina veterinaria han sido catalogados por la OMS como “antimicrobianos críticamente importantes” (Informe de la OMS, 2007), la resistencia a éstos es común en *E. coli* aislados de animales de granja y humanos y a menudo se encuentra asociada con resistencia a otros antimicrobianos no relacionados (SVARM, Bean et al., 2005). Todo esto concuerda con los resultados obtenidos sobre los patrones de antibióticos observados en los aislados del presente estudio, donde aquellos patrones que más se repetían eran los conformados por NA-AMP. Además, los plásmidos al ser elementos genéticos móviles pueden extender las resistencias a otras cepas promoviendo la transferencia horizontal entre bacterias (Thomas and Nielsen, 2005) generalizando multirresistencias en la población de bacterias del intestino. Esto explica que los patrones de multirresistencia con mayor prevalencia estuviesen constituidos por los antibióticos anteriormente comentados, NA-AMP-C, NA-AMP-TE, NA-AMP-CIP-TE; y que el resto de patrones se observaran con una prevalencia

menor al 1%, por lo que el patrón de multirresistencias tiende a homogeneizarse. Esto indica una posible selección y expansión de la población de bacterias con el genotipo mejor adaptado para el ambiente generado por la introducción de la presión selectiva de los antibióticos más utilizados.

Tras el estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos, con el objetivo de entender mejor los mecanismos de resistencia y con el fin de establecer sistemas óptimos de pruebas fenotípicas para la detección sensible, específica y rápida de genes de resistencia a antibióticos, se llevó a cabo la detección de genes de resistencia mediante PCR. Se seleccionaron diversos genes, los cuales se ha estudiado que codifican resistencia a los grupos de antibióticos más utilizados tanto en salud humana como en medicina veterinaria y para los cuales, tal y como se ha comentado, aparecieron mayor número de cepas resistentes. Los genes de resistencia a β -lactámicos estudiados fueron: *TEM*, *SHV* y *CMY-2* (Kozak et al., 2009); a tetraciclinas: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* (Lanz et al., 2003); a macrólidos: *ermB* (Chen et al., 2007); y finalmente a quinolonas: *qnrS* (Marti y Balcazar, 2011). Los resultados obtenidos son los esperados, ya que comparando con el estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos, se observa que los genes presentes en mayor número de cepas fueron los de resistencia a β -lactámicos, donde destacó el gen *TEM* (143 de los aislados presentaban este gen), Latifpour et al. (2016) obtuvo resultados similares a nuestro estudio, además en nuestro estudio la ampicilina fue el antibiótico para el que se encontró mayor número de cepas resistentes (121 de 191 aislados) lo que representa un 63,35%. Seguidamente el gen que se encontró en mayor número de aislados fue *qnrS* (116 de 191 aislados), lo que resulta un poco contradictorio con lo encontrado en la bibliografía, pues la mayoría de estudios detectaron el gen *qnrS* en una baja proporción, incluso en algunos casos no se detectó (Cano, et al., 2009; Poirel, et al., 2006; Yue, et al., 2009), pero para nuestros resultados sí es coherente, en cuanto a que el ácido nalidíxico fue el siguiente antibiótico con mayor prevalencia de resistencia (94 de 191 cepas). En el caso de genes de resistencia a tetraciclina, destacó el *tet(A)* (73 de 191 aislados) tal y como aparece en otros estudios (Kozak et al., 2009), donde se pone de manifiesto la elevada prevalencia del gen de resistencia a tetraciclinas *tet(A)* en *Escherichia coli* aislado de gallinas y otros animales de granja, y este antibiótico fue el que se encontró también en tercer lugar en cuanto a resistencia (69 de 191 cepas). Por último el gen *ermB* (34) se encontró en una baja tasa de prevalencia, hecho que también se ha observado en otros estudios (Phuc Nguyen, et al., 2009).

Por último, se observaron diferencias en las resistencias antibióticas según el origen de las cepas: heces y calzas. Aunque las diferencias no fueron significativas en la mayoría de los

casos, se encontraron que las muestras provenientes de calzas presentaron un mayor número de cepas resistentes a antibióticos que en heces. La explicación más lógica lleva a pensar que las cepas aisladas de calzas al estar en contacto con los restos del suelo entre los que encontramos plumas por ejemplo, es decir al quedar expuestas a la microbiota del ambiente pueden adquirir mayores resistencias, a través de transferencia horizontal de genes por plásmidos. Esto concuerda con lo observado en cuanto a los patrones de resistencias a antibióticos, donde aunque para ambas procedencias se encontró gran diversidad de patrones, en calzas el que más destacó fue el conformado por NA-AMP; mientras que en heces las resistencias únicas de TE y AMP fueron las más repetidas. Esto puede deberse de nuevo a que al entrar en contacto con el medio ambiente tienen más posibilidad de configurarse como resistentes a varios antimicrobianos debido a la agrupación de varios genes de resistencia en el mismo locus genético en el genoma. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en otros estudios (Alonso et al., 2001; Korzeniewska, et al., 2013) que ponen de manifiesto que la transferencia horizontal de genes de resistencia desde bacterias resistentes presentes en el medio ambiente, ya sea a animales como a humanos tienen lugar cada vez más a menudo.

En conclusión el estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos junto con la detección mediante PCR de genes de resistencia a antibióticos abre por tanto el camino a establecer métodos rápidos con los que estudiar este fenómeno con el fin de proporcionar datos sólidos, resultados e información científica sobre el nivel de resistencia a los antimicrobianos de forma que las autoridades sanitarias y gobiernos adopten las medidas necesarias destinadas a reducir el uso de antimicrobianos.

6. CONCLUSIONES

De todas las cepas estudiadas el 84,34% presentó resistencia a al menos uno de los antibióticos estudiados, dato coincidente con otros estudios a nivel europeo, lo que pone de manifiesto la necesidad por parte de las autoridades de controlar el uso de los antibióticos tanto en clínica como en ganadería.

No se encontró resistencia a los antibióticos ceftazidima y cefotaxima en ninguna de las 191 cepas estudiadas, lo que indicaría un adecuado uso veterinario de las cefalosporinas de 3ª generación y garantiza su uso seguro en clínica.

Los antibióticos para los que se encontraron mayor número de cepas resistentes fueron ampicilina, ácido nalidíxico y tetraciclina y éstos conformaron los patrones de resistencias más abundantes.

Las cepas que presentaron multirresistencia alcanzaron un 18,85% de los aislados, lo que indica la presencia de cepas con elementos genéticos móviles capaces de transportar resistencia a diferentes tipos de antibióticos.

Se encontraron 9 patrones de multirresistencias, siendo los más frecuentes NA-AMP-C y NA-AMP-TE, lo cual muestra que la presencia de determinados patrones de resistencia antibiótica tiende a homogeneizarse, evidenciando una posible selección y expansión de la población de bacterias con el genotipo mejor adaptado al ambiente.

El gen *TEM* que codifica resistencia a β -lactámicos fue el que se encontró en mayor número de cepas al igual que la ampicilina fue el antibiótico para el que más cepas manifestaron resistencia; lo mismo ocurrió con el gen *qnrS* y el ácido nalidíxico. Esto indica que los métodos moleculares de detección de genes de resistencia es una herramienta eficaz para la caracterización de resistencias antimicrobianas.

Las resistencias fueron mayores para los aislados de calzas que de heces, aunque las diferencias no fueron en la mayoría de los casos significativas, el aumento de éstas en calzas nos indica la influencia de microorganismos ambientales que pueden transferir elementos genéticos móviles y dispersar las resistencias y multirresistencias en el ambiente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AARESTRUP, F.M.; BAGER, F.; JENSEN, N.E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.C. (1998). Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *APMIS*, 106, 745–70.
- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146(3713), 837.
- ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J.L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes, *Environ Microbiol*, 3, 1-9.
- BAGER, F.; AARESTRUP, F.M.; MADSEN, M.; WEGENER, H.C. (1999). Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin. *Microb Drug Resist*, 5(1), 53-6.
- BINH, C.T.; HEUER, H.; GOMES, N.C.; KOTZERKE, A.; FULLE, M.; WILKE, B.M.; SCHLOTTER, M.; SMALLA, K. (2006). Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 62, 290–302.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A. (2010). Updated functional classification of betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 969–76.
- BUTLER, C.C.; HILLIER, S.; ROBERTS, Z.; DUNSTAN, F.; HOWARD, A.; PALMER, S. (2001). Antibiotic-resistant infections in primary care are symptomatic for longer and increase workload: outcomes for patients with *E coli* UTIs. *Br J Gen Pract*, 56(530), 686-92.
- CANO, M. E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; AGÜERO, J.; PASCUAL, A.; CALVO, J.; GARCÍA-LOBO, J. M.; VELASCO, C.; FRANCIA, M.V.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. (2009). Detection of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2033–2039.
- CARATTOLI, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemoter*, 53, 2227-2238.
- CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. (2014). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother*, 69(3), 827-34.
- CHEN, J.; YU, Z.; MICHEL JR, F.C.; WITTUM, T.; MORRISON, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4407-4416.
- CHOPRA, I.; HESSE, L.; O'NEILL, A. J. (2002). Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs, Volume 92, Issue s1, 4S–15S.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, P.A.: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

CROMBÉ, F.; WILLEMS, G.; DISPAS, M.; HALLIN, M.; DENIS, O.; SUETENS, C.; GORDTS, B.; STRUELENS, M.; BUTAYE, P. (2012). Prevalence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs in Belgium. *Microb Drug Resist*, 18(2), 125-31.

DAVIES, S. (2011). *Annual Report of the Chief Medical Officer*, Vol. 2. Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance. London. Department of Health, 2013.

DAZA R.M (1998). Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud Vol. 22N. o 3.

Department of Health. 2000. UK antimicrobial resistance strategy and action plan. London. European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial Resistance Interactive Database (EARS-NET). (2013).

European Food Safety Authority. (2008). Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *EFSA Journal*, 141, 1-44.

European Food Safety Authority; 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 Journal*, 14(2), 4380.

GARCIA-MIGURA, L.; HENDRIKSEN, R.S.; FRAILE, L.; AARESTRUP, F.M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet. Microbiol*, 14, 170 (1-2):1-9.

GHOSH, S.; LAPARA, T.M. (2007). The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J*, 1, 191–203.

HANON, J.B.; JASPERS, S.; BUTAYE, P.; WATTIAU, P.; MÉROC, E.; AERTS, M.; IMBERECHTS, H.; VERMEERSCH, K.; VAN DER STEDE, Y. (2015). A Trend Analysis of Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* from Several Livestock Species in Belgium (2011-2014). *Prev Vet Med*, 122 (4), 443-452.

HARRISON, P.F.; LEDERBERG, J. (1998). *Antimicrobial Resistance: Issues and Options, Workshop report. Forum on Emerging Infections*. National Academy Press, Division of Health Sciences Policy Institute of Medicine. Washington, DC.

HAWKEY, P.M.; JONES, A.M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*, 64 (suppl 1): i3–10.

HOLMES, D.; QUIGLEY, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114(1), 193-197.

HU, Y.; GAO, G.F.; ZHU, B. (2017). The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human being. *Front Med*, 11(2), 161-168.

- HU, Y.; YANG, X.; LI, J.; LV, N.; LIU, F.; WU, J.; ... ZHU, B. (2016). The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), 6672–6681.
- HUTCHISON, M.L.; WALTERS, L.D.; MOORE, A.; CROOKES, K.M.; AVERY, S.M. (2004). Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Appl Environ Microbiol*, 70, 5111–8.
- IBRAHIM, D.R.; Dodd, C.E.; Stekel, D.J.; Ramsden, S.J.; Hobman, J.L. (2016). Multidrug resistant, extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. *FEMS Microbiol Ecol*, 92(4), fiw013.
- KEEN, P. L.; MONTFORTS, M. H. M. M. (2011). *Antimicrobial Resistance in the Environment (1)*. Wiley-Blackwell. Hoboken, US.
- KORZENIEWSKA, E.; KORZENIEWSKA, A.; HARNISZ, M. (2013.) Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 91, 96-102.
- 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. *Appl Environ Microbiol*, 75, 559–566.
- LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol*, 91, 73–84.
- LATIFPOUR, M.; GHOLIPOUR, A.; DAMAVANDI, M.S. (2016). Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Nosocomial and Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Jundishapur J Microbiol*, 12, 9(3).
- LAXMINARAYAN, R.; AMABILE-CUEVAS, C.F.; CARS, O.; EVANS, T.; HEYMANN, D.L.; HOFFMAN, S.; HOLMES, A.; MENDELSON, M.; SRIDHAR, D.; WOOLHOUSE, M.; RØTTINGEN, JA. (2016a). UN High-Level Meeting on antimicrobials—what do we need? *Lancet*, 388(10041), 218–220.
- LAXMINARAYAN, R.; MATSOSO, P.; PANT, S.; BROWER, C.; ROTTINGEN, J.A.; KLUGMAN, K.; DAVIES, S. (2016b). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*, 9(387), 168–75.
- LIEBANA, E.; CARATTOLI, A.; COQUE, T.M.; HASMAN, H.; MAGIORAKOS, A.P.; MEVIUS, D.; PEIXE, L.; POIREL, L.; SCHUEPBACH-REGULA, G.; TORNEKE, K.; TORREN-EDO, J.; TORRES, C. (2013) Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis*, 56, 1030–7.
- LUVSANSCHARAV, U.O.; HIRAI, I.; NIKI, M.; SASAKI, T.; MAKIMOTO, K.; KOMALAMISRA, C.; MAIPANICH, W.; KUSOLSUK, T.; SA-NGUANKIAT, S.; PUBAMPEN, S.; YAMAMOTO, Y. (2011). Analysis of risk factors for a high prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing

Enterobacteriaceae in asymptomatic individuals in rural Thailand. *J Med Microbiol*, 60(Pt5), 619-24.

MAINOUS III, A. G.; POMEROY, C. (2010). *Management of antimicrobials in infectious diseases*. Humana Press. Totowa, N.J.

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*, 18, 268–281.

MARTI, E.; BALCAZAR, J.L. (2012). Real-time PCR assays for quantification of qnr genes in samples from different sources. *Appl. Environ. Microbiol*, 79, 1743-1745.

MARTINS DA COSTA, P.; BELO, A.; GONÇALVES, J.; BERNARDO, F. (2009). Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. *Veterinary Microbiology*, 139, 284–292.

MINH VIEN, L. T.; BAKER, S.; PHUONG THAO, L. T.; PHUONG TU, L. T.; THU THUY, C.; THU NGA, T. T.; ... SCHULTSZ, C. (2009). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in commensal members of the Enterobacteriaceae in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 12), 1585–1592.

MOUBARECK, C.; BOURGEOIS, N.; COURVALIN, P.; DOUCET-POPULAIRE, F. (2003). Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 2993–2996.

Organización agraria Coag (Cooperativas Agro-alimentarias). (2012). Anuario Agrario 2012.

Organización Mundial de la Salud. (2016). Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>

O'NEILL, J. (2014). *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*. *Rev Antimicrob Resist* 10.1038/ 510015^a.

PETER, M.; HAWKEY AND ANNIE M. JONES. (2009). The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*, 64 (suppl_1): i3-i10. doi: 10.1093/jac/dkp256.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *IntJMed Microbiol*, 300, 371–9.

PHUC NGUYEN, M.C.; WOERTHER, P.L.; BOUVET, M.; ANDREMONT, A.; LECLERCQ, R.; CANU, A. (2009). *Escherichia coli* as Reservoir for Macrolide Resistance Genes. *Emerg Infect Dis*, 15(10), 1648–1650.

POIREL, L.; LEVIANDIER, C.; NORDMANN, P. (2006). Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*, 50, 3992-3997.

- Prescription Pricing Authority. Trends in antibiotic prescribing in England. 2006.
- REGLAMENTO (CE) N o 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO (2003).
- ROSSOLINI, G.M.; ARENA, F.; PECILE, P.; POLLINI, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol*, 18, 56–60.
- SÁENZ, Y.; BRINAS, L.; DOMINGUEZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48, 3996-4001.
- SALYERS, A.A.; GUPTA, A.; WANG, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol*, 12(9), 412–416.
- SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev*, 28(5), 519-42.
- SÉVENO, N.A.; KALLIFIDAS, D.; SMALLA, K.; DIRK VAN ELSASY, J.; COLLARD, J.M.; KARAGOUNI, A.D.; WELLINGTON, E.M.H. (2002). Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Reviews in medical microbiology*, 13(1), 15-27.
- SIMONEIT, C.; BUROW, B.E.; TENHAGEN, A.; KÄSOBHRER, A. (2015). Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E.coli* from chicken – A systematic review. *Prev. Vet. Met*, 118, 1-17.
- SMET, A.; RASSCHAERT, G.; MARTEL, A.; PERSOONS, D.; DEWULF, J.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; HAESEBROUCK, F.; HERMAN, L.; HEYNDRIKX, M.; (2011). In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *J Appl Microbiol*, 110(2), 541-9.
- SMILLIE, C.S.; SMITH, M.B.; FRIEDMAN, J.; CORDERO, O.X.; DAVID, L.A.; ALM, E.J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, 480(7376), 241–244.
- SMITH, D.L.; HARRIS, A.D.; JOHNSON, J.A.; SILBERGELD, E.K.; MORRIS, J.G. (2002). Animal antibiotic use has a nearly but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl AcadSci*, 99, 6434–6439.
- STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G.A.; HOOPER, D.C.; ROBICSEK, A. (2009). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 664–689.
- SVARM 2005. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. ISSN 1650-6332., Bengtsson, B., Greko, C., Grönlund-Andersson, U., eds. (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden).
- SZMOLKA, A.; NAGY, B. (2013). Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol*, 3, 4: 258.
- TAHA, S.; YOUSSEF, N.; ELKAZAZ, A.; RAMADAN, H. (2015). Detection of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* using the ESBL NDP test and flow cytometric assay in comparison to the standard disc diffusion. *Afr J Microbiol Res*, 9(34), 1947-53. doi:10.5897/AJMR2015.7691.

THOMAS, C.M.; NIELSEN, K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol*, 3, 711–721.

VAN BOECKEL, T.P.; GANDRA, S.; ASHOK, A.; CAUDRON, Q.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; LAXMINARAYAN, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750.

WELLINGTON, E.M.H.; BOXALL, A.B.A.; CROSS, P.; FEIL, E.J.; GAZE, W.H.; HAWKEY, P.M.; JOHNSON-ROLLINGS, A.S.; JONES, D.L.; LEE, N.M.; OTTEN, W.; THOMAS, C.M.; WILLIAMS, A.P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*, 13, 155–65.

YUE, L.; JIANG, H. X.; LIAO, X. P.; LIU, J. H.; LI, S. J.; CHEN, X. Y.; CHEN, C. X.; LUE, D. H.; LIU, Y. H. (2008). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol*, 132, 414–420.