



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Evaluación del uso de antimicrobianos como factor
de riesgo relacionado con la aparición de
resistencia a cefalosporinas en *Escherichia coli* y
Salmonella en cerdos**

Antimicrobial use as a risk factor associated with the emergence of
cephalosporin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp in
pigs



Karla Cameron Veas

Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

Departamento de Sanidad y Anatomía Animal

Facultad de Veterinaria

2016

Evaluación del uso de antimicrobianos como factor de riesgo relacionado con la aparición de resistencia a cefalosporinas en *Escherichia coli* y *Salmonella* en cerdos

Antimicrobial use as a risk factor associated with the emergence of cephalosporin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* spp in pigs

Karla Cameron Veas

Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

Departamento de Sanidad y Anatomía Animal

Facultad de Veterinaria

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

CR_eSA IRTA^R
Centre de Recerca en Sanitat Animal
RECERCA | TECNOLOGIA
AGROALIMENTARIES

La Dra. Lourdes Migura García, investigador del centro de investigación de sanidad animal CReSA-IRTA. El Dr. Lorenzo Fraile Sauce, docente e investigador de la Universidad de Lleida, ambos directores de tesis. Y el Dr. Joaquim Segalés Coma, Director CReSA-IRTA, tutor de tesis:

Certifican:

Que la tesis doctoral titulada: “Evaluación del uso de antimicrobianos como factor de riesgo relacionado con la aparición de resistencia a cefalosporinas en *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en cerdos”, ha sido realizada por Karla A. Cameron Veas, en el Centro de Investigación de Sanidad Animal CReSA-IRTA, formando parte del curso de postgrado del Departamento de Sanidad y anatomía animal, Facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Dra. Lourdes Migura García

Dr. Lorenzo Fraile Sauce

Directores de Tesis

Dr. Joaquim Segalés Coma

Tutor de Tesis

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

CReSA IRTA
Centre de Recerca en Sanitat Animal
RECERCA | TECNOLOGIA
AGROALIMENTÀRIES

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto AGL2011-28836 del Ministerio de Economía y Competitividad de España

La impresión de la tesis doctoral fue financiada por CReSA- IRTA



UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

CReSA **IRTA**
Centre de Recerca en Sanitat Animal
RECERCA | I | TECNOLOGIA
AGROALIMENTÀRIES

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar y experimentar el bello y maravilloso mundo del saber”



La sensación de agradecimiento frente a esta etapa de mi vida es enorme. Durante todo este tiempo que he estado haciendo el doctorado, no tan solo he crecido de forma profesional, sino el crecimiento personal ha sido aun mayor. Soy una Karla muy distinta a la que comenzó hace 4 años atrás este desafío, soy Karla 2.0, mucho más consciente y agradecida de todas las personas que han formado parte de mi vida durante este tiempo, algunas se han ido, otras aun permanecen, pero de cada una de ellas estoy tremendamente agradecida y he logrado reconocer la enseñanza del por que se han cruzado en mi camino.

Especialmente les agradezco a mis amados y maravillosos padres, sin ellos el permanecer en Barcelona jamás habría sido posible, la gran beca Cameron-Veas es la mejor de las becas y por ellos les doy las gracias infinitas.

Mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis Lourdes Migura, gracias por confiar en mí no tan solo para formar parte de este gran proyecto, sino que también por abrirme las puertas de tu linda familia...el estar con tus angelitos, ha sido una gran enseñanza para mí. Quizás existieron momentos de discordia, pero fueron muy pocos, mas me quedo con la gran calidad humana que siempre te caracterizó. El apoyo que me brindaste, no tan solo en el trabajo, sino también en lo personal ha hecho que siempre me haya sentido motivada durante todo este tiempo.

También agradecer a mi otro director de tesis, Lorenzo Fraile, la etapa de las visitas a granja para mí fueron una gran experiencia, y poder contar contigo siempre cuando necesite de tu apoyo, son cosas que me dejan el corazón muy contento. Sin duda me siento muy afortunada de haber tenido dos directores muy profesionales, pero sobretodo con una gran calidad humana, lo que hizo mucho más llevadero el doctorado.

A mis compañero y amigos del CReSA, los Killer QLT's y Chichipatos gracias por los lindos momentos y por su amistad, siempre los llevare en mi corazón. Y solo decirles a los que aún quedan en este camino...animó!! que se puede, hay momentos oscuros, pero la satisfacción cuando depositas la tesis es tan plena, que sin duda vale la pena enfrentarse a este desafío.

Agradecer la ayuda y enseñanzas de todos los técnicos de laboratorio y estudios de campo, y a todo el personal del CReSA, que en algún momento de estos 4 años formaron parte de este proyecto.

A mis amigos de la vida dispersos por distintos lugares del mundo, pero que si bien se reúnen en un lugar en común...en mi corazón. Gracias totales por existir en mi vida y ser parte del aprendizaje que es vivir.

Simplemente agradezco a la vida por darme esta oportunidad de experimentar y crecer cada día. Ser más consciente de que cada momento es una nueva oportunidad para evolucionar en pro de un mundo mejor y sin duda más que obtener un título profesional con el doctorado, estoy obteniendo una sabiduría que aportara al menos con un granito de arena para el bienestar de nuestro planeta. Sat Nam



RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar si existe asociación entre el consumo de antimicrobianos en granjas convencionales de porcino, y la presencia de enterobacterias resistentes a cefalosporinas (RC), como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. A la vez, se evaluó si la granja era un reservorio de genes de RC, si éstos estaban asociados a plásmidos transferibles y si dichos plásmidos eran similares a los que están presentes en cepas humanas. Para ello se realizaron tres estudios. En el Estudio 1 se evaluó si los tratamientos con ceftiofur y posteriormente con amoxicilina eran factores de riesgo en la emergencia de *E. coli* RC en una granja de cerdos de engorde. Para ello se seleccionaron 100 lechones de 7 días de edad y se dividieron en dos grupos, un grupo control ($n=50$) y otro grupo tratado parenteralmente con ceftiofur en dosis única ($n=50$). Durante el período de engorde, ambos grupos fueron subdivididos en dos grupos. A dos de ellos se les administró un segundo tratamiento con amoxicilina en pienso. Los grupos formados fueron: grupo sin tratar, grupo tratado con amoxicilina, grupo tratado con ceftiofur y grupo tratado con ceftiofur y amoxicilina. Durante el tratamiento con ceftiofur se recolectaron muestras fecales antes del tratamiento (día 0), día 2, 7, 14, 21 y 42 después del tratamiento, mientras que durante el tratamiento con amoxicilina, el muestreo se extendió a 73 días después tratamiento. Se seleccionaron *E. coli* RC y los aislados fueron analizados por electroforesis de campo pulsado (PFGE) y concentración mínima inhibitoria (MIC) a 14 antimicrobianos. Además se detectó la presencia de genes de RC y se tipificaron los replicones de los plásmidos. Ambos tratamientos generaron un incremento en la prevalencia de *E. coli* RC, el cual fue estadísticamente significativo en los grupos tratados, disminuyendo la RC después del tratamiento. Un total de 47 aislados de *E. coli* RC fueron recolectados durante el estudio; en ellos se encontraron los siguientes genes de resistencia; CTX-M-1 (15), CTX-M-14 (10), CTX-M-9 (4), CTX-M-15 (2) y SHV-12 (5), mayormente asociados a plásmidos conjugativos de los grupos de incompatibilidad *Incl1* e *IncN*. El tratamiento con ceftiofur y amoxicilina fue asociado con la emergencia de *E. coli* RC durante el curso del tratamiento. Sin embargo, al final del ciclo productivo, antes de que los animales partieran a matadero, no se aislaron cepas de *E. coli* RC.

Los estudios 2 y 3 se llevaron a cabo en ocho granjas de cerdos de engorde convencionales en las que se aplicaban programas de medicina preventiva basados en el uso de antimicrobianos. En ellas se estudió la emergencia de

E. coli RC (Estudio 2) y *Salmonella* RC (Estudio 3) después del tratamiento con ceftiofur y tulatromicina durante la lactación. Cuatro granjas se trataron con ceftiofur y otras cuatro con tulatromicina. En cada granja, 70 lechones de 7 días de edad fueron divididos en dos grupos; grupo control ($n = 30$) y grupo tratado ($n = 40$). Se recolectaron muestras fecales a día 0 (antes del tratamiento), día 2, 7 y 180 después del tratamiento. Las madres también fueron muestreadas a día 0. Además, se evaluó si los recuentos de *E. coli* RC con respecto a la población total de *E. coli*, aumentaban con el uso del tratamiento. En cinco de las ocho granjas, los lechones de 7 días de edad excretaban *E. coli* RC antes de ser tratados. La prevalencia de animales positivos a *E. coli* RC fue disminuyendo a medida que aumentaba la edad de los animales. Las tres granjas restantes fueron negativas durante todo el estudio independientemente del tratamiento aplicado. Los resultados mostraron gran variabilidad en la frecuencia de animales positivos en las diferentes granjas. Un aumento transitorio de *E. coli* RC se observó en los recuentos 48 horas después de haber aplicado el tratamiento con ceftiofur. Sin embargo, otros factores de riesgo, como la presencia de madres positivas y la edad de los animales parecen tener una mayor relevancia en la persistencia de *E. coli* RC, que el tratamiento aplicado. El Estudio 3, además de evaluar el efecto del tratamiento con ceftiofur o tulatromicina en la emergencia de *Salmonella* RC investigó la presencia de cepas de *Salmonella* multirresistentes. Se caracterizaron genotípicamente y fenotípicamente los aislados obtenidos y se determinó la presencia de diferentes genes de resistencia, así como los plásmidos que portaban dichos genes de RC. Se aislaron 66 cepas de *Salmonella* en 5 de las ocho granjas. De estas, 49 fueron multirresistentes y 4 de ellas contenían genes *bla*_{CTX-M} albergados en plásmidos conjugativos de la familia *Incl1*. Estas cepas RC fueron aisladas en una misma granja antes que los animales fueran tratados con ceftiofur, y desaparecieron durante el curso del tratamiento. Los genes *tet(A)* (77%), *sul1* (27%), y *tet(B)* (23%) fueron los más prevalentes, y 10 aislados contenían *qnrB* que confiere baja susceptibilidad a fluoroquinolonas. En este estudio no se pudo establecer una relación directa entre el uso de ceftiofur y la emergencia de *Salmonella* RC. Sin embargo la mayoría de los aislados fueron multirresistentes conjuntamente a ampicilina, estreptomina, sulfamidas y tetraciclinas. Estos antimicrobianos son frecuentemente usados en los programas de medicina preventiva veterinaria. En conjunto, hemos observado un aumento transitorio de cepas de *E. coli* RC durante el tratamiento con ceftiofur, cosa que no observamos con *Salmonella*. Sin embargo, cepas RC, tanto de *E. coli* como de *Salmonella*, fueron aisladas de

animales de siete días antes de someterlos a tratamiento, sugiriendo la circulación de estas cepas en la granja. Hubo animales que partieron a matadero excretando *E. coli* RC y *Salmonella* multirresistentes con genes y plásmidos similares a los encontrados en cepas de origen humano. Por lo tanto, nuestros estudios indican que la granja es un reservorio de cepas multirresistentes que pueden llegar al consumidor si entran en la cadena alimentaria. Para minimizar la emergencia de bacterias resistentes, es importante hacer un uso más racional de los antimicrobianos, así como definir estrategias para reducir la circulación de cepas resistentes, tanto dentro de las granjas, como en sistemas integrados de producción.

ABSTRACT

The main objective of this thesis was to evaluate the association between management practices in relation with antimicrobial consumption in pig farms and the emergence of cephalosporin resistant (CR) *E. coli* and *Salmonella*. Moreover, the studies intended to elucidate if the farm was a reservoir of resistance genes harboured in transferable plasmids similar to those found in the community. For this purpose, three studies have been conducted. Study 1 evaluated if the treatments with ceftiofur and amoxicillin are risk factors for the emergence of CR *E. coli* in a conventional pig farm during the rearing cycle. One-hundred seven-day-old piglets were divided into two groups, control (n=50) and parenterally treated with ceftiofur (n=50). During the fattening period, both groups were subdivided in two. A second treatment with amoxicillin was administered in-feed to two of the groups; untreated group, group treated with amoxicillin, group treated with ceftiofur and group treated with ceftiofur and amoxicillin. During treatment with ceftiofur, faecal samples were collected before treatment (day 0) and at days 2, 7, 14, 21 and 42 post-treatment, whereas with amoxicillin, the sampling was extended 73 days post-treatment. CR *E. coli* isolates were genotypically and phenotypically characterised by PFGE, and MIC. The presence of CR genes was assessed and plasmids analysed by replicon typing. Both treatments generated an increase in the prevalence of CR *E. coli*, which was statistically significant in the treated groups. Resistance diminished after treatment. A total of 47 CR *E. coli* were recovered during the study period, 15 contained *bla*_{CTX-M-1}, 10 *bla*_{CTX-M-14}, four *bla*_{CTX-M-9}, two *bla*_{CTX-M-15} and five *bla*_{SHV-12}. The treatment with ceftiofur and amoxicillin was associated to the emergence of CR *E. coli* during the course of the treatment. However, by the finishing time CR *E. coli* were not recovered from the animals.

Study 2 and 3 were conducted in eight conventional pig farms that applied preventive veterinary programmes based on antimicrobial use. In four of these farms, 7-day-old piglets were treated with ceftiofur and in the remaining four with tulathromycin. At each farm, 70 7-day-old piglets were divided into two groups; a control group (n = 30) and a treated group (n = 40). Faecal samples were taken at day 0 (before medication), 2, 7 and 180 days post-treatment (time of slaughter). Sows were also sampled at day 0. Study 2 also assessed the dynamics of CR *E. coli* populations during the life cycle. In five of the eight farms, 7-day-old piglets excreted CR *E. coli* before treatment. The occurrence of CR *E. coli* positive animals decreased with

increasing piglets' age. The remaining three farms were negative for CR *E. coli* during the study period. Results demonstrated great variability in the frequency of positive animals between farms, independently of treatment. The treatment with ceftiofur resulted in a transitory increase in the counts of CR *E. coli* after 48 hours. However, other risk factors, such as the presence of CR *E. coli* in sows, and the age of the animals had a more relevant role in shedding of CR *E. coli* than the treatment. Study 3 assessed the effect of the treatments with ceftiofur or tulathromycin in the emergence of CR *Salmonella* and multiresistant *Salmonella*. Phenotypic and genotypic characterization of the *Salmonella* isolates were performed. A total of 66 *Salmonella* isolates were recovered from five of the eight farms. Of them, 49 were multiresistant and four contained *bla*_{CTX-M} genes harboured in conjugative plasmids of the *Incl1* family. They were recovered from the same farms before treatment with ceftiofur. *tet*(A) (77%), *sul1* (27%), and *tet*(B) (23%) genes were the most prevalent, and 10 isolates also presented *qnrB*. A direct relation was not established between the use of ceftiofur and the occurrence of CR *Salmonella*. However, multidrug resistant was common, especially for ampicillin, streptomycin, sulphonamides and tetracycline. These antimicrobials are the most frequently used in preventive veterinary programmes in Spain. Overall, the treatment with ceftiofur resulted in a transitory increase in both, the proportion of animals shedding CR *E. coli* and the counts. We did not observed the same increase in prevalence for CR *Salmonella*. However, CR *E. coli* and CR *Salmonella* were detected in 7-day-old piglets before administration of any treatment, suggesting the presence of resistant strains circulating in the farm. Some of the animals departed to the abattoir excreting CR *E. coli* and *Salmonella* with a multiresistant phenotype. CR genes were associated to transferrable plasmids with similar replicons to those found in isolates of human origin. These results indicated that the farm is a reservoir of resistant genes and plasmid that can reach the consumer via the food chain. To minimize the emergence of resistant bacteria and protect the consumer health, a more rational use of antimicrobials should be implemented in intensive farming. Intervention strategies should be develop to reduce the re-circulation of resistant isolates within pig farms, as well as within integrated production systems.

La línea de investigación de esta tesis relacionada con la emergencia de enterobacterias resistentes a antimicrobianos, ha dado origen a las siguientes publicaciones en revistas científicas, divulgación en congresos nacionales e internacionales y colaboraciones en otros estudios relacionados con la misma línea de investigación.

PUBLICACIONES

Impact of the use of β -lactam antimicrobials on the emergence of *Escherichia coli* isolates resistant to cephalosporins under standard pig-rearing conditions. Cameron-Veas K, Solà-Ginés M, Moreno MA, Fraile L, Migura-Garcia L. Appl Environ Microbiol. 2015 Mar; 81(5):1782-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548055>

Shedding of cephalosporin resistant *Escherichia coli* in pigs from conventional farms after early treatment with antimicrobials. Cameron-Veas K, Moreno MA, Fraile L, Migura-Garcia L. Vet J. 2016 May; 211:21-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27053016>

Houseflies (*Musca domestica*) as Vectors for Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Spanish Broiler Farms. Solà-Ginés M, González-López JJ, Cameron-Veas K, Piedra-Carrasco N, Cerdà-Cuéllar M, Migura-Garcia L. Appl Environ Microbiol. 2015 Jun; 81(11):3604-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795670>

Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Causing Outbreaks of Colibacillosis in Broilers during 2012 in Spain. Solà-Ginés M, Cameron-Veas K, Badiola I, Dolz R, Majó N, Dahbi G, Viso S, Mora A, Blanco J, Piedra-Carrasco N, González-López JJ, Migura-Garcia L. PLoS One. 2015 Nov 23;10(11). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26600205>

CONGRESOS

Federal European Microbiology Society, FEMS Alemania, Julio 2013. “Impact of the use of ceftiofur on the emergence of *Escherichia coli* resistant to cephalosporins in a pig Farm”. **Karla Cameron-Veas**, Marc Solà-Ginés, Zoraida Cervera, Miguel A. Moreno, Lorenzo Fraile and Lourdes Garcia-Migura.

5th Symposium Antimicrobial Resistance in Animal and the Environment, ARAE Bèlgica, Junio 2013: “Amoxicillin as a risk factor associated to the emergence of *Escherichia coli* resistant to cephalosporins in a pig farm”. **Karla Cameron-Veas**, Marc Solà-Ginés, Miguel A. Moreno, Lorenzo Fraile and Lourdes Garcia-Migura.

10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10), Paris, Octubre, 2013. “Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from different outbreaks in Spain during 2012”. M. Solà Ginés, **K. Cameron Veas**, I. Badiola, Roser Dolz, Natalia Majó, G. Dahbi, S. Viso, A. Mora, J. Blanco, L. García-Migura.

50^o Congreso de Avicultura, Lleida, Octubre 2013. “Diversidad de cepas multirresistentes de *Escherichia coli* de alta patogenicidad en aves causantes de diferentes brotes de colibacilosis en España durante el 2012”. M. Solà Ginés, **K. Cameron Veas**, I. Badiola, R. Dolz, N. Majó, G. DAHBI, S. viso, A. Mora, J. Blanco y L. García-Migura.

24th ECCMID European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases. Mayo 2014, Barcelona. “Presence of Cephalosporin resistant *Salmonella* from pig farms using different medication regimes” **Karla Cameron-Veas**, Marc Solà-Ginés, Lorenzo Fraile, Lourdes Garcia-Migura.

23rd IPVS International Pig Veterinary Society Congress, Junio 2014, México. “Impact of the use of ceftiofur on the emergence of *Escherichia coli* resistant to cephalosporins in four conventional pig farms” **Karla Cameron-Veas**, Miguel Ángel Moreno, Lourdes Garcia-Migura and Lorenzo Fraile.

23^d IPVS International Pig Veterinary Society Congress, Junio 2014, México.
“Impact of the use of ceftiofur on the emergence of *Salmonella* resistant to cephalosporins in four conventional pig farms”. **Karla Cameron-Veas**, Miguel Ángel Moreno, Lorenzo Fraile, Lourdes Garcia-Migura.

24th IPVS International Pig Veterinary Society Congress, Junio 2016, Dublin.
“Cephalosporin resistant *Salmonella* isolated from conventional pig farms under different medication regimes”. **Karla Cameron-Veas**, Lorenzo Fraile and Lourdes Garcia-Migura.

ABREVIACIONES

BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
BW	Body Weight
CES	Cefalosporinas de espectro extendido
CFU/g	Colony formation units per gram
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CR	Cephalosporin resistant
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECOFF	Epidemiological cutt-off values (puntos de cortes epidemiológicos)
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ESBL	Extended spectrum betalactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
gr	Gramos
ITU:	Infección del tracto urinario
L	Litros
mg	Miligramos
MIC	Minimum inhibitory concentration (concentración mínima inhibitoria)
mL	Mililitros
mm	Milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBPs	Penicillin binding proteins (proteína ligadora de penicilina)
PFGE	Pulsed- field gel electrophoresis (electroforesis de campo pulsado)
PMQR	Plasmid mediated quinolone resistance
RC	Resistente a cefalosporinas
SAS	Sistema de análisis estadístico
SHU	Síndrome urémico hemolítico
STEC	<i>E. coli</i> shigatoxigénicas
Stx	Shigatoxigénicas
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
µL	Micro litro
VT	Verotoxigénicas
WHO	World Health Organization
WT	Wild Type (Tipo salvaje)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.-Enterobacterias.....	3
1.1.- <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	3
1.2.- <i>Salmonella</i> spp.	11
2.-Antimicrobianos.....	17
2.1.-Antibióticos de la familia de los betalactámicos.....	19
2.2.- Cefalosporinas.....	23
2.2.1.- Mecanismo de acción	23
2.2.2.- Clasificación y espectro de la actividad de las cefalosporinas	23
2.2.3.- Uso de cefalosporinas en medicina humana	26
2.2.4.- Uso de cefalosporinas en animales para el consumo humano	26
3.- Resistencia Antimicrobiana.....	27
3.1.- Tipos de resistencia antimicrobiana	34
3.2.- Multirresistencia antimicrobiana.....	36
3.3.- Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana	36
3.3.1.- Modificación enzimática del antibiótico.....	37
3.3.2.- Bombas de expulsión del antibiótico.....	37
3.3.3.- Cambios en la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria	37
3.3.4.- Alteraciones de las dianas del antibiótico	38
3.4.- Mecanismos de transferencia de genes de resistencia	39

3.4.1.- Conjugación.....	40
3.4.2.- Transformación	40
3.4.3.- Transducción	40
3.5.- Plataformas genéticas para la movilización de genes.....	41
3.5.1.- Plásmidos	41
3.5.2.- Transposones	47
3.5.3.- Integrones	47
4.- Genes de Resistencias	48
4.1.- Betalactamasas.....	49
4.1.1.- Clasificación de las Betalactamasas	49
4.1.2.- Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	53
4.1.3.- Betalactamasas de tipo AmpC.....	56
4.2.- Resistencia a cefalosporinas en <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp.	59
5.- Utilización de los antimicrobianos en la industria porcina	63
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
ESTUDIO 1: Emergencia de <i>E. coli</i> RC en una granja convencional	69
Resumen.....	71
Introducción	73
Materiales - Métodos	75
Resultados	80
Discusión.....	88

ESTUDIO 2: Factores de riesgo asociados a la presencia de <i>E. coli</i> RC	93
Resumen.....	95
Introducción	97
Materiales - Métodos.....	99
Resultados.....	104
Discusión	111
ESTUDIO 3: Caracterización de <i>Salmonella</i> de granjas convencionales de cerdos.	117
Resumen.....	119
Introducción	121
Materiales - Métodos.....	123
Resultados.....	127
Discusión	136
DISCUSIÓN GENERAL	141
CONCLUSIONES	155
REFERENCIAS	157
ANEXOS	185

“Tú eres la verdad. Cada vez que hablas la verdad con el corazón abierto, esa es la llave al corazón de cada persona” Y.B.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En 1928, cuando Alexander Fleming descubrió casualmente la penicilina en una placa de petri contaminada por hongos, se inició una nueva era de la medicina. Este compuesto natural producido por el hongo *Penicillium* demostró ser tóxico para las bacterias, pero seguro para el ser humano y los animales. Así, la utilización de la penicilina durante la segunda guerra mundial permitió salvar cientos de miles de vidas. Este científico al recibir el premio Nobel por su gran descubrimiento en 1945, ya advirtió del riesgo que podría correr la humanidad al no utilizar de forma responsable estos medicamentos.

La resistencia antimicrobiana se ha definido como la capacidad de un microorganismo de multiplicarse o resistir en presencia de un agente antimicrobiano en relación con la población bacteriana susceptible de la misma especie (WHO, 2011). Si bien la resistencia a los antimicrobianos es un proceso de selección natural que ocurre por un fenómeno de evolución de las especies bacterianas, y se produce por mutaciones o por intercambio/adquisición de genes de resistencia, este proceso se ha incrementado. La forma de producir, prescribir y utilizar los antimicrobianos en medicina humana y ganadería, ha producido un aumento incesante del número y de los tipos de microorganismos resistentes a estos medicamentos. Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, las malas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de alimentos, también han propiciado la propagación de resistencia a estos agentes, por lo tanto la resistencia no es un fenómeno nuevo y se ha evidenciado que es un problema que trasciende el ámbito sanitario a nivel mundial (Torres, 2012).

Por lo tanto, el aumento y la propagación de los microorganismos resistentes a los antimicrobianos tiene dos factores determinantes: el uso excesivo e indebido de los antimicrobianos, y la propagación de los microorganismos resistentes entre las personas y los animales extendiéndose a la población humana en un mismo país y a otros países.

En ganadería, la práctica habitual de tratar a los animales utilizando los antimicrobianos de forma profiláctica, en particular, haciendo uso de agentes antimicrobianos definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), de “importancia crítica” en medicina humana (Collignon et al., 2009), como son las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, ha incrementado el número de bacterias entéricas resistentes en los animales de producción y ha generado un problema de salud pública. Si estos animales al momento de ser enviados a matadero contienen microorganismos resistentes, aumenta el riesgo de que estos microorganismos entren a la cadena alimentaria y por tanto lleguen al consumidor.

"Cuando eres tranquilo, quieto y sensible te puedes expandir. Pero cuando eres irritado, neurótico, insensible y miedoso, no puedes lograr nada" Y.B.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.-Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprófitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales, además del hombre. *Escherichia coli*, es uno de los microorganismos más prevalente de esta familia, y por otro lado *Salmonella* spp., que también pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Ambos son considerados agentes zoonóticos de distribución a nivel mundial.

1.1.-*Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli es un microorganismo que forma parte de la microbiota intestinal de personas y de animales sanos, al mismo tiempo es un importante patógeno implicado en múltiples procesos infecciosos. También pueden causar graves enfermedades de transmisión alimentaria (FAO, 2011). Algunas cepas de *E. coli* pueden causar una amplia variedad de enfermedades intestinales y extra intestinales, como son, diarreas, infecciones del tracto urinario, septicemia y meningitis neonatal (Orskov et al., 1992). También puede causar neumonías e infecciones post-quirúrgicas.

Debido a su alta presencia en el intestino, *E. coli* se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos. Si bien la mayoría de las cepas dentro

del intestino son agentes gastrointestinales beneficiosos para el ser humano, otros son perjudiciales.

Las *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad de provocar graves enfermedades como resultado de su información genética, debido a la producción de toxinas, capacidad de adhesión e invasión de células huésped, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos (FAO, 2011). Principalmente se pueden transmitir al hombre por el consumo de agua y alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas. Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarreas, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (WHO, 2015).

Las diferentes cepas de *E. coli* que producen enfermedades se clasifican de acuerdo con el tipo de síntomas clínicos que pueden producir en los seres humanos y según los mecanismos comunes de patogenicidad (FAO, 2011). Estos tipos de cepas se pueden dividir en diferentes variedades, algunas de las cuales mencionaremos por su relevancia (FAO, 2011).

***E. coli* shigatoxigénica (STEC)** es una de las variedades, que provoca síntomas que van desde una diarrea suave hasta diarreas graves con sangre. En casi el 10 % de los pacientes, especialmente niños y adultos mayores, la infección puede evolucionar a enfermedad con riesgo vital, como el síndrome hemolítico urémico (SHU). Las ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)** son un

subconjunto de las *E. coli* shigatoxigenicas (STEC), asociadas generalmente a diarreas con sangre y síndrome hemolítico urémico (SHU), que producen citotoxinas conocidas como verotoxigénicas (VT) o shigatoxigénicas (Stx). La cepa de *E. coli* O157:H7 es el serotipo EHEC más importante ligado a las enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que se traduce en una alta incidencia de infecciones y muertes por EHEC cada año (FAO, 2011). Su importancia como problema de salud pública se hizo patente en 1982, después de un brote registrado en los Estados Unidos de Norte América (Pennington, 2010). *E. coli* O157:H7 es el serotipo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) más importante por su impacto en salud pública, pero hay también otros serotipos implicados en brotes y casos esporádicos como el serotipo de *E. coli* O104:H4 ocurrido en Alemania el 2011, donde se experimentó el mayor brote de casos de STEC jamás registrado en este país: se notificaron un total de 3.842 casos, incluidos 2.987 casos confirmados de *E. coli* con gastroenteritis, un total de 18 muertes y 855 casos de síndrome urémico hemolítico (SHU) que dieron lugar a 35 casos fatales (Muniesa et al., 2012).

En Europa, el número de casos de *E. coli* productoras de shigatoxina (STEC/VTEC) en el 2012 disminuyó en un 40% respecto al 2011 (5.671 frente a 9.485 casos en 2011), debido a los casos de *E. coli* O104:H4 producidos por este brote que se dio en Alemania y Francia asociado al consumo de semillas germinada (EFSA-ECDC, 2014a). No obstante, aun eliminando los datos de 2011, la tendencia para el período 2008-2012 es creciente. España notificó 31 casos confirmados en el 2012 y la tendencia, al igual que en la UE, es de aumento en los últimos años (EFSA-ECDC, 2014a). Sin embargo los casos más

frecuente son debido a brotes de *E. coli* O157:H7 encontradas en hamburguesas poco cocidas, salame curado, sidra fresca no pasteurizada, yogur y queso elaborado con leche cruda. Además, un número creciente de brotes se asocian al consumo de frutas y verduras (coles de bruselas, espinacas, lechuga, ensaladas de col y de otro tipo) contaminadas por el contacto con las heces de animales domésticos o salvajes en algún momento durante su cultivo o manipulación. También se ha aislado EHEC en masas de agua (estanques, arroyos), pozos y abrevaderos, y se ha observado que puede sobrevivir durante meses en el estiércol y en los sedimentos de recipientes de agua. Se ha informado de casos de transmisión por el agua, tanto por agua de bebida contaminada, como por aguas de recreo (piscinas). Los contactos de persona a persona son una forma de transmisión importante por vía oro-fecal (WHO, 2001). Existe un estado de portador asintomático, en el que la persona no muestra signos clínicos de la enfermedad pero puede infectar a otros. La excreción de EHEC dura aproximadamente una semana o menos en los adultos, pero puede prolongarse más en los niños. Se ha observado que otro factor de riesgo importante de infección por EHEC son las visitas a granjas y otros lugares donde el público en general puede entrar en contacto directo con el ganado.

E. coli se aísla casi en el 90% de los casos de infección del tracto urinario (ITU) adquirida en la comunidad, seguido de *Klebsiella*, *Proteus* y *Enterococcus* (Perez, 1997). En líneas generales, más del 90% de las cepas de *E. coli* y de otras enterobacterias aisladas en ITU extra hospitalarias son sensibles a cefalosporinas de 3ª generación, pero al menos el 50% son resistentes a amoxicilina y cotrimoxazol (Daza-Perez, 1998). En el período 2002-2009 se

observó un alarmante incremento en la proporción, por ejemplo, de cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro en la mayor parte de los países europeos y, así mismo, se observó un incremento en la proporción de cepas de *E. coli* resistentes a 2, 3 o 4 familias de antibióticos de gran relevancia clínica como aminopenicilinas, cefalosporinas de amplio espectro, fluoroquinolonas o aminoglucósidos (Gagliotti et al., 2011).

Los programas de vigilancia que se han diseñado para controlar el incremento de microorganismos resistentes a antimicrobianos, han seleccionado bacterias que están ampliamente diseminadas en muchos ecosistemas y que a la vez pueden actuar como microorganismos comensales y como patógenos. Esto permite analizar la presión selectiva de los antimicrobianos en los distintos ambientes. *E. coli* cumple con estos requisitos, por lo que son bacterias candidatas para el estudio de vigilancia y son consideradas como bacterias “centinelas de la resistencia”.

En ganadería porcina, *E. coli* puede producir infecciones clínicas a nivel intestinal en los animales jóvenes, conocidas como colibacilosis entérica y diarreas neonatales. Estas pueden derivar en septicemias, como coliseptisemia o colibacilosis sistémica (Bencomo, 2014). En cerdos de mayor edad puede causar enteritis post-destete y enfermedad de los edemas como manifestación de la toxina que produce *E. coli* (Schwartz, 2005). En animales adultos *E. coli* puede aparecer en infecciones oportunistas fuera del tracto intestinal como en glándulas mamarias, tracto urinario y útero.

La colibacilosis neonatal provocada por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) principalmente afecta a terneros, corderos y lechones recién nacidos. Las

cepas enteropatógenas de *E. coli* producen enterotoxinas que provocan en los animales diarreas intensas, deshidratación, debilitamiento de los animales y muchos dejan de mamar. Los animales moderadamente afectados pueden recuperarse espontáneamente, pero aquellos con una infección severa sino son debidamente tratados, pueden morir en un par de días (Moon et al., 1986).

En los lechones provoca una deshidratación, que puede causar pérdida de peso en un 40%, conduciendo a una acidosis metabólica. La diarrea puede aparecer a pocas horas tras el nacimiento afectando a lechones aislados o a la camada completa. Las camadas de primerizas son en general las más afectadas, así como los lechones de menor peso entre la camada, ya que suelen ser los que toman menor cantidad de calostro, teniendo una lactancia de menor calidad (Schwartz, 2005).

La prevalencia de este tipo de enfermedad es muy variable en función de la calidad sanitaria de las instalaciones, de la inmunidad de las cerdas y de la virulencia de las cepas. La gravedad de la diarrea disminuye a medida que aumenta la edad de los lechones y la mortalidad también es muy variable, llegando a ser muy elevada en lechones de pocos días de edad de cerdas sin inmunidad y/o cuando se retrasa el tratamiento.

La rapidez del tratamiento es esencial para que sea lo más eficaz posible. Hay muchos antibióticos que, teóricamente, pueden tener una buena eficacia contra *E. coli*, pero también son muy frecuentes las resistencias (Dunlop et al., 1998). Por ello, es conveniente realizar en cada granja antibiogramas periódicos que permitan elegir los antibióticos más eficaces. En general,

algunas quinolonas y cefalosporinas tienen una buena actividad. En conjunto el control de la deshidratación y acidosis ayuda a la recuperación de los lechones afectados. En la profilaxis son fundamentales las condiciones ambientales. Así, las salas de parto y las maternidades limpias, con adecuadas condiciones de temperatura y ventilación son críticas para el control de

esta enfermedad. Además, la vacunación de las cerdas es una de las medidas más eficaces para prevenir la colibacilosis de los lechones lactantes si se garantiza una buena ingesta de calostro.

EPEC posee una combinación de factores de adhesión y enterotoxinas que son necesarias para producir un cuadro intestinal inmediatamente que los animales son destetados, provocando diarreas post destetes por *E. coli* (Amezcueta et al., 2002). Los signos clínicos se producen casi siempre alrededor de las dos semanas tras el destete, con un brote de diarrea amarillenta-blanquecina, cremosa-acuosa, diarrea en proyectil. El período de incubación es de sólo 10 a 30 horas; por lo que rápidamente habrá muchos cerdos afectados en el grupo. Los cerdos muestran en seguida deshidratación y pérdida de condición corporal.

Las cepas de *E. coli* involucradas en la enfermedad de los edemas en cerdos, tienen unas características parecidas a EPEC respecto a la epidemiología y a la patogénesis de la adhesión al intestino. Contienen verotoxinas o toxinas semejantes a Shiga específicas, como la Stx2e (Schwartz, 2005). Dichas toxinas entran en el torrente circulatorio del cerdo y dañan vasos sanguíneos extra-intestinales, produciendo signos neurológicos y edema gelatinoso en la

cabeza, párpados, laringe, estómago y mesocolon. La enfermedad aparece también alrededor de dos semanas tras el destete (Schwartz, 2005). El primer signo es a menudo la muerte súbita de unos pocos cerdos. Los principales signos clínicos de los grupos afectados son apatía, ataxia, estupor, postración y locomoción torpe. Para el manejo y control de brotes de colibacilosis post-destete y enfermedad de los edemas es importante conocer la historia de la enfermedad en la explotación, y la sensibilidad a los antibióticos de las *E. coli* presentes. Se debe controlar la deshidratación de los cerdos (Schwartz, 2005). Los antibióticos utilizados a menudo para el tratamiento de *E. coli* son apramicina y neomicina. En cerdas y vacas adultas, cepas oportunistas de *E. coli* pueden producir mastitis, llegando a las glándulas mamarias por el conducto del pezón o por vía hemática, multiplicándose intensamente. Esto da lugar a manifestaciones clínicas locales y generalizadas.

1.2.-*Salmonella* spp.

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, en la que se diferencian dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall et al., 2005). Dentro de la especie *enterica* se incluyen las subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Tindall et al., 2005).

La diferenciación de distintos aislamientos dentro de una especie o subespecie puede conseguirse mediante la determinación de serogrupos y serotipos, basados en la variabilidad antigénica según el esquema de Kauffmann-White. Dentro del género *Salmonella* se incluyen 51 serogrupos o grupos O (Grimont, 2007), definidos por los antígenos somáticos mayores, que a su vez se clasifican en hasta 2.610 serotipos diferentes (Guibourdenche et al., 2010) en función de la combinación de antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) de cada aislamiento particular (Collazos, 2013). *Salmonella enterica* es la especie que causa un 99 % de infecciones en humanos y animales de consumo (Uzzau et al., 2000), especialmente la subespecie *enterica*.

Cabe mencionar que para *Salmonella* spp., a diferencia de otras bacterias, normalmente no se menciona el género (*Salmonella*) ni la especie (*enterica* o *bongori*), sino el género, expresado en cursiva, seguido del serotipo en letra normal, es decir *S. Typhimurium*, que sería *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, serotipo Typhimurium.

Los serotipos de *Salmonella* se dividen en dos grupos, basado en el rango de hospedadores; hospedadores adaptados y hospedadores ubicuos (no

adaptados). Los serotipos adaptados causan enfermedad sistémica en un limitado número de especies relacionadas. Por ejemplo, *S. Typhi*, *Gallinarum* y *Abortus ovis*, están casi exclusivamente asociada con enfermedad sistémica en los seres humanos (Edsall et al., 1960), aves (Barrow et al., 1994) y ovinos (Pardon et al., 1988), respectivamente. Sin embargo, algunos serotipos huéspedes adaptados también pueden causar enfermedad en más de una especie; por ejemplo *Dublín* y *Choleraesuis*, se asocian generalmente a severas enfermedades sistémicas en ganado vacuno y cerdos respectivamente, pero también con menos frecuencia puede causar infección en otros mamíferos, inclusive en humanos (Wray et al., 1977; Nnalue, 1991).

Salmonella es considerado un agente causante de zoonosis de distribución mundial y de importancia económica tanto en humanos como en animales. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar. Se encuentra en la carne cruda de aves, huevos, carne de vacuno y, algunas veces, en las frutas y vegetales sin lavar. También se puede adquirir tras manipular mascotas exóticas, especialmente reptiles como las serpientes, tortugas y lagartos, ya que algunas serovariedades de *Salmonella* son comunes en la piel de este tipo de animales (Acha P., 2001).

Los síntomas de infección por *Salmonella* son muy similares a los causados por *E. coli*, cursando fiebre, diarreas, cólicos abdominales, dolor de cabeza y pueden presentar náuseas, vómitos y pérdida del apetito. Los síntomas suelen durar entre cuatro y siete días. La mayoría de las personas mejora sin tratamientos, aunque pueden ser más graves en niños, ancianos y personas

inmunodeprimidas. La salmonelosis también se ha asociado, a largo plazo, con secuelas crónicas, como por ejemplo, artritis reactiva. La fiebre tifoidea, una de las enfermedades más serias causada por *S. Typhi*, ocurre con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo. Algunas personas pueden convertirse en portadores sanos y continuar expulsando la bacteria en sus heces durante años, diseminando así la infección. Si *Salmonella* penetra en el torrente sanguíneo, puede causar problemas serios y debe ser tratada con antimicrobianos. El tratamiento de elección para la infección por *Salmonella* son fluoroquinolonas, trimetoprim sulfametoxazol o amoxicilina con ácido clavulánico para adultos y cefalosporinas de tercera generación para los niños (EFSA-ECDC, 2012).

En la Unión Europea (UE), la salmonelosis es, tras la campilobacteriosis, la segunda zoonosis más frecuente, habiéndose registrado 108.614 casos en humanos en 27 estados miembros en 2009, de los que 4.420 se produjeron en España (EFSA-ECDC, 2012b). En el 2012 se notificaron 91.034 casos confirmados de salmonelosis, siendo un 4.7% menos que el año anterior, observándose en el período 2008-2012 una tendencia significativamente descendente, lo que se asume a los programas de control de *Salmonella* en aves aplicado en los países europeos. En el último reporte entregado por EFSA en el año 2016, se notificaron 88.715 casos de salmonelosis en el 2014 y de estos 6.643 se produjieron en España (EFSA, 2016).

España ocupa una posición intermedia entre los países de la UE, y la tendencia en los últimos años es descendente. Los serotipos predominantes, al igual que en Europa, son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (EFSA, 2014). En España, el 85% de los brotes de gastroenteritis infecciosa de origen

alimentario es causado por *Salmonella*, siendo un importante problema de salud pública. Los casos de *S. Enteritidis* en humanos son más comúnmente asociados con el consumo de huevos contaminados y la carne de aves, mientras que los casos de *S. Typhimurium* se asocian principalmente con el consumo de carne de cerdo contaminada, bovino y aves de corral (EFSA et al., 2013). *Salmonella* no tifoidea se encuentra ampliamente distribuida entre diferentes especies animales (incluidas las mascotas), pero es particularmente prevalente entre los animales criados para el consumo (pollos, gallinas, patos, pavos), siendo los huevos la principal fuente de infección en humanos.

Salmonella entra en la granja a través de la compra de nuevos animales, pudiendo permanecer en las explotaciones infectadas durante largos períodos. Los animales se pueden contagiar directamente por vía oro-fecal, o indirectamente a través de contaminación fecal del medio ambiente (Farzan et al., 2006; Hauser et al., 2011), agua, pienso y por vectores como roedores, moscas y pájaros, que pueden actuar como huéspedes reservorios. En determinadas especies y tipos de animales se producen también transmisiones intrauterinas y transplacentarias. Los factores estresantes pueden desencadenar la enfermedad. En general, muchos animales se convierten en portadores y pocos enferman. La excreción fecal de *Salmonella* no necesariamente es indicativa de una infección real en el animal. El microorganismo ingresa a través de la mucosa del intestino delgado, y se localiza en el tejido linfóide vecino al intestino, donde puede permanecer durante mucho tiempo. El diagnóstico correcto de esta infección en cerdos

requiere la identificación de este patógeno en los linfonodos mesentéricos (Garrido et al., 2014).

En aves, *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* son capaces de transmitirse transováricamente (a través de los huevos). Pueden producir retraso del crecimiento y caída de la producción. *S. Pullorum* causa pulorosis, enfermedad sistémica que afecta a animales jóvenes menores de 3 semanas (Snoeyenbos, 1994). Y *S. Typhimurium* produce tifosis, enfermedad septicémica que afecta a animales de mayor edad.

En el ganado bovino, *S. Dublin* provoca una enfermedad que dura varios días o semanas, y muestra varias fases (septicémica, orgánica, entérica o intestinal y articular). Los terneros pueden morir debido a un curso sobragudo (OIE, 2008).

Los cerdos pueden infectarse recién destetados hasta los mayores de 5 meses (Pastrana A, 2005). La enfermedad puede presentarse de dos formas clínicas diferentes: enterocolítica, causada por *S. Typhimurium* y septicémica, causada por *S. Cholerasuis*. La salmonelosis enterocolítica se presenta desde el destete hasta los cuatro meses de edad, pero ocasionalmente puede presentarse en maternidad y en la fase de engorde. Puede producir un cuadro infeccioso agudo o crónico (Blood, 2002). Entre los signos clínicos puede observarse una diarrea acuosa de color amarillo, inicialmente sin sangre ni moco; que demora de 3 a 7 días y puede repetirse dos o tres veces más, dando la impresión de una enfermedad diarreica fluctuante de varias semanas de duración. La sangre puede aparecer esporádicamente. También se presenta fiebre, disminución del apetito y

deshidratación (Blood, 2002). Generalmente no presenta alta mortalidad, la mayoría de los animales se recuperan totalmente, pero continúan como portadores, eliminando intermitentemente la bacteria por algunos meses (OIE, 2008). La enfermedad entérica es frecuente en animales después del destete.

La salmonelosis septicémica ocurre principalmente en cerdos destetados de menos de cinco meses de edad. Es rara su presentación en cerdos lactantes. Puede presentarse en cerdos listos para ser llevados al matadero, lo que figura un riesgo de contaminación de la canal si en matadero se produce algún fallo en la línea de faena. Los animales afectados presentan inapetencia, fiebre, tos húmeda, se niegan a moverse. Se evidencian varios animales muertos con el abdomen y las extremidades púrpuras (cianosis)(Blood, 2002). La diarrea no es una característica de esta forma septicémica, hasta el tercer o cuarto día de la enfermedad, cuando se observan heces líquidas y amarillas. La mortalidad es alta y la morbilidad variable, pero por lo general del 10%. Los animales que se recuperan quedan como portadores y continúan eliminando la bacteria a través de las heces (OIE, 2008). El estrés causado por el transporte aumenta la susceptibilidad de los animales a sufrir infecciones, sobretodo de salmonelosis (Manteca, 2014).

La salmonelosis en el cerdo tiene una importancia doble. Esta bacteria puede causar enfermedades en el cerdo y, por otra parte, los cerdos pueden actuar como reservorio de *Salmonella* siendo una de las principales fuentes de contaminación de la carne y de los productos cárnicos (OIE, 2008). Se pueden esperar altas cargas bacterianas en el tracto intestinal de los cerdos que

pueden causar altas tasas de contaminación en todos los niveles de la cadena de producción (Tadee et al., 2015). El procedimiento de faena de los cerdos, en si mismo puede ser una fuente importante de contaminación de la canal, sobretodo si no se realiza de forma correcta (Gomes-Neves et al., 2012), siendo una de las vías de diseminación de *Salmonella* hacia el consumidor (Wray, 2000).

2.-Antimicrobianos

Los antimicrobianos se definen, como medicamentos que destruyen los microorganismos o impiden su multiplicación o desarrollo (Matute, 2008). Estos fármacos, se dividen en antibacterianos o antibióticos, antivirales, antimicóticos, antimicobacterianos, antiparasitarios y antirretrovirales (MacDougall et al., 2005).

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio que suprimen el crecimiento de bacterias y pueden eventualmente destruirlas. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Martinez et al., 2015). Se utilizan para el tratamiento, control y prevención de las enfermedades infecciosas en humanos y animales, causadas por bacterias, siendo totalmente inefectivos en las enfermedades virales (MacDougall et al., 2005, Martinez, 2015). Los antibióticos también se utilizan en agricultura, aunque en menor medida (Torres, 2012)

Durante mucho tiempo (desde la década de 1950), los antibióticos también se han empleado como promotores del crecimiento en animales (especialmente para el engorde de aves y de cerdos), aunque este uso está totalmente prohibido desde 2006 en toda la UE; sin embargo, todavía se utilizan con este fin en países de otros continentes (Torres, 2012).

Un antibiótico puede ser bacteriostático si impide el crecimiento de los gérmenes, y bactericida si los destruye (Tabla I). No obstante, los antibióticos también tienen un efecto secundario, no deseado, ya que actúan ejerciendo una presión selectiva sobre las bacterias que componen la compleja microbiota de las personas y de los animales, favoreciendo la selección de bacterias resistentes.

En la actualidad la definición de un antibiótico está siendo usada para incluir a los antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos, como las quinolonas, sulfamidas y otros agentes antimicrobianos derivados de productos naturales y aquellos con propiedades antibióticas descubiertas empíricamente (Strohl, 1997).

Tabla I. Clasificación de los antibióticos dependiendo de su actividad y concentración.

Acción	Familia	Antibiótico
Bactericida tiempo dependientes.	<ul style="list-style-type: none"> • Betalactámicos • Glucopéptidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Penicilinas, cefalosporinas • Vancomicina
Bactericida dependiente de la concentración	<ul style="list-style-type: none"> • Aminoglucósidos • Quinolonas 	<ul style="list-style-type: none"> • Gentamicina • Ácido nalidíxico • Ciprofloxacino
Bacteriostáticos preferentemente	<ul style="list-style-type: none"> • Macrólidos • Tetraciclina • Fenicoles 	<ul style="list-style-type: none"> • Tulatromicina • Tetraciclina • Cloranfenicol

2.1.-Antibióticos de la familia de los betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos tienen en común su estructura molecular con un anillo betalactámico, el cual es responsable en gran parte de su acción antimicrobiana. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Este grupo de antibióticos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico (Marin et al., 2003). Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a las enterobacterias Gram negativas (Tabla II); pero la progresiva aparición de

resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones clásicas. Las cefalosporinas lo son en la profilaxis quirúrgica y en infecciones comunitarias graves, las carbapenemas en infecciones nosocomiales mixtas causadas por bacterias multirresistentes. Los inhibidores de betalactamasas permiten el uso eficaz de las amino (amoxicilina) y ureido (piperacilina) penicilinas en infecciones de gran relevancia. Además, actúan de manera reversible o irreversible inhibiendo a muchas de las enzimas betalactamasas bacterianas. Estos inhibidores carecen de actividad antimicrobiana intrínseca, por lo que suelen ser administrados en conjunto con antibióticos betalactámicos, reduciendo la acción que le confiere resistencia a ciertas bacterias en contra de estos antibióticos. Los tres inhibidores de betalactamasas usados en la clínica médica son el ácido clavulánico, por lo general combinado con amoxicilina, ampicilina o con ticarcilina, el sulbactam combinado con la cefoperazona y el tazobactam combinado con la piperacilina.

La resistencia que desarrollan las bacterias frente a los antimicrobianos betalactámicos representa un grave problema, ya que es uno de los grupos de antibióticos más utilizados. Las bacterias desarrollan mecanismos de resistencias que son independientes entre sí, pero que pueden actuar sinérgicamente. La producción de enzimas inactivantes por parte de enterobacterias Gram negativas, es sin duda el mecanismo de resistencia más importante a antimicrobianos betalactámicos, ya que la adquisición de enzimas betalactamasas (plasmídicas o cromosómicas), es la causa más frecuente de resistencias (Daza-Perez, 1998). Las betalactamasas plasmídicas

en bacterias Gram negativas producen alto nivel de resistencia y están muy extendidas, sobre todo entre las enterobacterias, algunas son de espectro extendido y confieren resistencia a la totalidad de los antibióticos betalactámicos (Daza-Perez, 1998).

Tabla II. Antibióticos betalactámicos más importantes.

Grupo		Antibiótico
Penámicos	Penicilina	Penicilinas G, penicilina V.
	Aminopenicilinas	Ampicilina, amoxicilina.
	Carboxipenicilinas	Carbenicilina, ticarcilina, caxfecilina, carindacilina, sulbenicilina.
	Acilampinilinas	Meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, nafcilina.
	Oxazolilpenicilinas	Ticarcilina, carbenicilina, sulbenicilina.
	Antipseudomonales	Pivampicilina, bacampicilina.
	Farmacocineticamente Mejorados	Epicilina, ciclacilina.
Cefalosporinas	1ª generación	Cefalotina, cefapirina, cefradina, cefazolina, cefalexina, cefaloridina, cefazaflur, cefaradina, ceftazolone, cefasetrile, cefaprin, cefaloglicina, cefaridine.
	2ª generación	Cefaclor, cefuroxina, cefotiam, cefadroxilo, cefbuperazone, cefodicina, cefamandole nafato, ceforamida, cefodizina, cefonicid.
	3ª generación	Cefotaxima, Ceftriaxona, cefpodoxima, ceftizoxima, cefoperazona, ceftazidima, moxalactam, cefmenoxima, cefsulodina, cefodizima, cefixima, ceftibuten, ceftiofur.
	4ª generación	Cefepime, cefpiroma, cefoselina, ceclidina, cefozopram, cefluprenam, cequinoma.
	Cefamicinas ^a	Cefoxitina, cefotetan, cefmetazole.
	Carbacefemas ^a	Loracarbete.
Clavamas		Ac. clavulánico, sulbactam, tazobactam.
Carbapenemas		Tienamicina, ac. olivanico, carpetimicina, imipenen, meropenem, panipenem, ertapenem.
Monobactamas		Aztreonam, carumonam.

^a se corresponden con la 2ª generación de cefalosporinas (Pociello, 2007)

2.2.- Cefalosporinas

En 1955, y a partir de la purificación de la penicilina N producida por el hongo *Cephalosporium acremonium* (*Cremonium chrysogenum*), se descubrió la cefalosporina C, capaz de absorber fuertemente la luz ultravioleta, estable en medio ácido, resistente a las enzimas degradadoras de las penicilinas y de baja toxicidad (Blanc, 2007). La principal desventaja fue su baja potencia de acción. A partir de la década de los 60 y con el conocimiento de la ruta de biosíntesis de la cefalosporina C, se han ido obteniendo diversos grupos de cefalosporinas semi-sintéticas, lo cual ha llevado a ampliar su espectro antibacteriano, su estabilidad frente a la hidrólisis por enzimas bacterianas y sus propiedades farmacocinéticas.

2.2.1.- Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las cefalosporinas es esencialmente el mismo que el de la bencilpenicilina y otros antibióticos betalactámicos; interfieren con la formación de la pared celular mediante la unión a las enzimas que son activas en la síntesis de peptidoglicanos [transpeptidasas, también llamadas proteínas de unión a la penicilina (PBP)]. Todas las cefalosporinas derivan del ácido 7-aminocefalosporánico que, de la misma forma que la penicilina, tienen un anillo betalactámico y un anillo dihidrotiazínico. Una amplia variedad de cefalosporinas han sido generadas por sustituciones de los diversos grupos en diferentes posiciones del núcleo (Marshall et al., 1999).

2.2.2.- Clasificación y espectro de la actividad de las cefalosporinas

Las cefalosporinas se agrupan y se clasifican en base a su espectro de actividad in vitro, en las similitudes estructurales y hasta cierto punto, el año

de introducción (Marshall et al., 1999). La clasificación tradicional de estas moléculas en "generaciones", agrupadas de acuerdo con el sistema de clasificación de drogas Anatomical Therapeutic Chemical (ATC), y controlado por la OMS. Se clasifican de la siguiente manera (Tabla III).

Tabla III. Clasificación de cefalosporinas de 1ª a 4ª generación y espectro de acción (Rivas et al., 2002).

1ª GENERACION	ESPECTRO DE ACCIÓN
CEFALEXINA	Principal espectro contra bacterias Gram positivas (<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> y <i>Corynebacterium</i>) y otros estafilococos productores de penicilinasas. Actividad sólo contra algunos Gram negativos (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i>), considerándose en general escasa la actividad frente a Gram negativos.
CEFADROXILO	
CEFALOTINA	
CEFAPIRINA	
CEFAZOLINA	
CEFRADINA	
2ª GENERACION	
CEFACLOR	Similar actividad que las de la primera generación contra Gram positivos. Se incrementa la actividad contra Gram negativos como <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> . Mayor resistencia contra betalactamasas. Ligera acción contra anaerobios.
CEFAMANDOL	
CEFONICID	
CEFOTETAN	
CEFOXITINA	
CEFUROXIMA	
3ª GENERACION	
CEFTRIAXONA	Mayor espectro de acción contra Gram negativos que las anteriores generaciones. Incluso poseen acción contra Gram negativos resistentes a otros antibióticos. Pueden ser utilizadas contra Gram positivas aunque la actividad es variable. Tienen mayor estabilidad a muchas de las betalactamasas que inactivan las cefalosporinas de la generación anterior y otros antibióticos betalactámicos.
CEFTIOFUR	
CEFOTAXIMA	
CEFOVECIN	
LATAMOXEF	
CEFAPERAXONA	
4ª GENERACION	
CEFQUINOMA	Actividad mucho más amplia contra bacterias Gram negativas, ya que tienen una mayor estabilidad en comparación con los compuestos de tercera generación, con mayor resistencia a betalactamasas.
CEFEPIMA	

2.2.3.- Uso de cefalosporinas en medicina humana

Las cefalosporinas son ampliamente utilizadas en medicina humana. En los hospitales, cefalosporinas de tercera y cuarta generación se utilizan para tratar septicemias, meningitis, neumonías adquiridas en el hospital, infecciones intra-abdominales e infecciones complicadas del tracto urinario (Paterson et al., 2005). También se recomienda el uso de cefalosporinas de espectro extendido para el tratamiento de salmonelosis (Gonzalez-Sanz et al., 2009).

En los informes entregados por la OMS, destacan el incremento y la generalización de resistencias a cefalosporinas de última generación que se ha generando en microorganismos como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* alrededor del mundo, siendo la causa de muchos de los fracasos en el tratamiento de algunas enfermedades en los seres humanos.

2.2.4.- Uso de cefalosporinas en animales para el consumo humano

El ceftiofur y la cefquinoma, cefalosporinas de tercera y cuarta generación respectivamente, se han desarrollado exclusivamente para su uso en medicina veterinaria (Hornish et al., 2002).

Ceftiofur es utilizado en diferentes animales destinados al consumo humano, como bovinos y cerdos, para el tratamiento de enfermedades respiratorias producidas por bacterias, septicemias, poliartritis o poliserositis en cerdos, necrobacilosis interdigital aguda y metritis agudas post-parto en bovino (EMA, 2009), cuando el tratamiento con otro antimicrobiano ha fallado.

Cefquinoma también se utiliza en bovinos y cerdos. En el tratamiento de epidermitis exudativa, meningitis, enfermedades respiratoria de origen bacteriano y en el síndrome MMA (mastitis, metritis, agalactia) en cerdas (EMA, 1999). En bovinos se utiliza en mastitis agudas, infecciones respiratorias, infecciones podales y septicemias en terneros.

Las cefalosporinas en veterinaria en lo posible, solo deben utilizarse en base a pruebas de susceptibilidad. El uso sistémico de cefalosporinas en animales destinados al consumo humano que podría seleccionar microorganismos resistentes es preocupante debido al papel que estos animales pueden desempeñar en la difusión de cefalosporinasas de espectro extendido dentro de la población humana. Por lo tanto, la vigilancia de las resistencias a los antimicrobianos de importancia crítica para la salud humana, como son las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación en organismos indicadores, tales como *E. coli*, como los propuestos por la legislación de la UE (Directiva 2003/99/CE) ha adquirido cada vez más importancia.

3.- Resistencia Antimicrobiana

La utilización terapéutica de la penicilina y otros antibióticos a partir de los años cuarenta ha sido uno de los logros más importantes de este siglo. Desde entonces se han obtenido, comercializado y utilizado una gran cantidad de antimicrobianos y sin embargo, así como al comienzo de la era antibiótica se tenía la falsa esperanza de que las enfermedades producidas por microorganismos desaparecerían, pronto se puso de manifiesto que las bacterias eran capaces de desarrollar mecanismos de resistencia (Daza-

Perez, 1998), y así en los años 50 ya se conocían cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina (Daza-Perez, 1998).

En la práctica una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella y supone una gran ayuda para el control de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección (García de Lomas J, 1998).

Una de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana cualitativa mas utilizada en la práctica diaria es la realización del test de susceptibilidad antimicrobiana o antibiograma (difusión en disco) (Taroco R, 2008), que tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos, y traducir, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica (Canton, 2010). Este método permite clasificar directamente a la bacteria como sensible o resistente frente al antibiótico (Taroco R, 2008).

Por otra parte, la concentración mínima inhibitoria (MIC) es un método cuantitativo donde se mide la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida del microorganismo) (Taroco R, 2008). La determinación de la MIC puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o test comercial (Taroco R, 2008).

El International Organization for Standardization (Turnidge et al., 2006) ha refinado las categorías clinicas de sensibilidad de un microorganismo frente a

los antimicrobianos con el objetivo de evitar la confusión al momento de la interpretación de los antibiogramas o MIC. Estas han quedado definidas en función de la probabilidad del éxito o del fracaso terapéutico, clasificándolas en:

Sensible: cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.

Intermedio: cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.

Resistente: cuando un aislado bacteriano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico (Canton, 2010).

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en Estados Unidos, como el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) en Europa, han establecido puntos de corte, bien en valores de halos de inhibición (antibiograma) o de MIC, para separar estas categorías (sensible, intermedio, resistente) (Canton, 2010). El CLSI publica anualmente las actualizaciones de estos datos y son de pago, mientras que el EUCAST publica permanentemente estos valores en su página web. Ambos comités tienen vocación internacional.

Los puntos de corte clínicos son capaces de dividir la población bacteriana en sensible o resistente. Así, es resistente, si sobrevive a una terapia

antimicrobiana concreta (Guardabassi, 2006; Martinez et al., 2015), asociándose dicha resistencia a una alta probabilidad de que un tratamiento con dicho antibiótico falle (CReSA-MAGRAMA, 2012).

EUCAST también ha establecido los denominados **puntos de corte epidemiológicos (ECOFF)** puntos que separan las poblaciones que carecen, o no expresan mecanismos de resistencia (tipo salvaje) de aquellas que los presentan y lo expresan. Los puntos de corte epidemiológicos se definen en base a la distribución de las distintas especies bacterianas expuestas a distintas concentraciones de cada uno de los antimicrobianos. Un microorganismo de una especie bacteriana se define como tipo salvaje, cuando no ha adquirido ni mutaciones ni mecanismos de resistencia para un cierto antimicrobiano. El punto de corte epidemiológico permite determinar cuándo se observa un aumento de la resistencia en relación al tipo salvaje, independientemente de la respuesta al tratamiento con dicho antimicrobiano. Los puntos de corte que definen la categoría clínica sensible no necesariamente han de coincidir con los ECOFF (Turnidge et al., 2006).

Para la interpretación de los resultados de pruebas de sensibilidad, algunos países utilizan puntos de corte clínicos, conforme a lo dispuesto por el CLSI o una combinación de puntos clínicos de CLSI y EUCAST, dependiendo del antimicrobiano (Tabla IV y V). Algunos países utilizan otros criterios como valores de corte epidemiológicos (ECOFFs) proporcionados por EUCAST (EFSA et al., 2013).

Tabla IV. Antibióticos que se incluyen actualmente en el seguimiento de las resistencias, umbrales de resistencia de EUCAST que deben utilizarse para el ensayo con *Salmonella* spp. y el indicador comensal *E. coli*.

Antibiótico	Especie	Umbrales interpretativos de la resistencia (mg/L)	
		Valor de corte epidemiológico (a)	Valor crítico clínico (b)
Ampicilina	<i>Salmonella</i>	> 8	> 8
	<i>E. coli</i>	> 8	> 8
Cefotaxime	<i>Salmonella</i>	> 0,5	> 2
	<i>E. coli</i>	> 0,25	> 2
Ceftazidime	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4
	<i>E. coli</i>	> 0,5	> 4
Meropenem	<i>Salmonella</i>	> 0,125	> 8
	<i>E. coli</i>	> 0,125	> 8
Ácido nalidíxico	<i>Salmonella</i>	> 16	n. d.
	<i>E. coli</i>	> 16	
Ciprofloxacino	<i>Salmonella</i>	> 0,064	> 1
	<i>E. coli</i>	> 0,064	> 1
Tetraciclina	<i>Salmonella</i>	> 8	n. d.
	<i>E. coli</i>	> 8	
Colistina	<i>Salmonella</i>	> 2	> 2
	<i>E. coli</i>	> 2	> 2
Gentamicina	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4
	<i>E. coli</i>	> 2	> 4
Trimetoprim	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4
	<i>E. coli</i>	> 2	> 4
Sulfametoxazol	<i>Salmonella</i>	n. d.	n. d.
	<i>E. coli</i>	> 64	
Cloranfenicol	<i>Salmonella</i>	> 16	> 8
	<i>E. coli</i>	> 16	> 8
Azitromicina	<i>Salmonella</i>	n. d.	n. d.
	<i>E. coli</i>		
Tigeciclina	<i>Salmonella</i>	> 1 (*)	> 2 (*)
	<i>E. coli</i>	> 1	> 2

(a) Valores de corte epidemiológicos de EUCAST, (b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST.,(*) Datos de EUCAST disponibles para *S. Enteritidis*, *Typhimurium*, *Typhi* y *Paratyphi*, n. d.: No disponibles (BOE, 2013a).

Tabla V. Antibióticos, valores de corte epidemiológicos, valores críticos de EUCAST que deben utilizarse únicamente para someter a prueba las cepas de *Salmonella* spp. y del indicador comensal *E. coli* resistentes a cefotaxima, ceftazidima o meropenem.

Antibiótico	Especie	Umbral interpretativo de la resistencia (mg/L)	
		Valor de corte epidemiológico ^(a)	Valor crítico clínico ^(b)
Cefoxitina	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	> 8 > 8	n. d.
Cefepima	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	n. d. > 0,125	n. d. > 4
Cefotaxima + ácido clavulánico (*)	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	n. d. (**)	n. d. (**)
Ceftazidima + ácido clavulánico (*)	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	n. d. (**)	n. d. (**)
Meropenem	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	> 0,125 > 0,125	> 8 > 8
Temocilina	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	n. d.	n. d.
Imipenem	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	> 1 > 0,5	> 8 > 8
Ertapenem	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	> 0,06 > 0,06	> 1 > 1
Cefotaxima	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	> 0,5 > 0,25	> 2 > 2
Ceftazidima	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	> 2 > 0,5	> 4 > 4

(a) Valores de corte epidemiológicos de EUCAST. (b) Valores críticos (entre resistencia y respuesta intermedia) de EUCAST. n. d.: No disponible. (*) 4 mg/L de ácido clavulánico. (**) Los valores se compararán con los valores de cefotaxima y ceftazidima y se interpretarán con arreglo a las directrices de CLSI o EUCAST relativas al test de sinergia (BOE, 2013a).

La aparición de resistencia a los antibióticos en veterinaria y en agricultura parece ser similar a la de los humanos, ya que se han estado empleando grandes cantidades de medicamentos antiinfecciosos no sólo para tratar a animales enfermos, sino también de forma profiláctica (WHO, 2001). Es de suma importancia considerar en la práctica diaria los distintos tipos y mecanismos de resistencia que presentan las bacterias frente a los antimicrobianos disponibles, y tenerlos en cuenta a la hora de instaurar un tratamiento antibacteriano, ya que es conocido que las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y coste, que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie (Holmberg et al., 1987). Un importante avance que sitúa a la UE como líder mundial en este ámbito, es la legislación que prohíbe que los antibióticos usados en humanos se puedan emplear como promotores del crecimiento en piensos para animales.

Hoy en día se sabe que los antibióticos no se limitan a favorecer la selección de bacterias resistentes a los mismos, sino que también son capaces de incrementar la tasa de mutación de las bacterias, acelerando la variabilidad genética y aumentando, por tanto, las posibilidades de adquisición de resistencias (Baquero F, 2002).

Desde mediados de la década de los 90, y en especial en los últimos años, las autoridades y el mundo científico han comenzado a tomar una mayor conciencia sobre las dimensiones del problema de la resistencia a los antimicrobianos. La resistencia no solo afecta a microorganismos patógenos de interés clínico, que se aíslan a partir de procesos infecciosos del hombre o animales, sino que también afecta a bacterias comensales (no patógenas)

que forman parte de la microbiota normal de los humanos y animales, especialmente la que forma parte del intestino (Torres, 2012). Por otra parte, también afecta a otros ecosistemas como el agua, suelo, alimentos, que se han visto expuestos a residuos antimicrobianos provenientes de los distintos ámbitos (Torres, 2012). Además, algunos mecanismos de resistencia altamente preocupantes podrían haber surgido en ecosistemas naturales y, posteriormente, podrían haber pasado al ambiente hospitalario (Cattoir et al., 2008; Canton, 2009; Martinez, 2009).

3.1.- Tipos de resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana puede ser natural o intrínseca; y se produce cuando la bacteria carece de diana para un antibiótico, siendo propia de cada familia, especie o grupo bacteriano (Daza-Perez, 1998). Por ejemplo, todos los gérmenes Gram negativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no varía, o la falta de pared en *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos.

La resistencia antimicrobiana **adquirida**, es variable y es obtenida “*a posteriori*” por una cepa de una especie bacteriana, como por ejemplo cepas de neumococos que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *E. coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la meticilina.

Desde un punto de vista clínico, es la resistencia más importante, ya que se produce por una modificación de la carga genética de la bacteria, por mutación cromosómica, o por mecanismos de transferencia genética (Daza-Perez, 1998). La resistencia adquirida es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el

microorganismo que produce la infección. La resistencia antimicrobiana adquirida por mutación cromosómica, puede ir seguida de la selección de los mutantes resistentes. Por otra parte, la resistencia adquirida transmisible es la más importante, ya que está mediada por plataformas genéticas como los plásmidos, transposones o integrones, que se pueden transferir de una bacteria a otra (García de Lomas J, 1998), como en el caso de *E. coli* resistente a colistina. Hasta el momento se conocía que la resistencia a las polimixinas, entre las que se encuentra la colistina, ocurría por mutaciones cromosómicas y no se había descrito la transferencia horizontal de genes que confirieran resistencia a este antibiótico considerado de última línea para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes (WHO, 2016). Sin embargo, en un estudio realizado en China (Liu et al., 2016) se reportó la detección de mecanismos de resistencia a colistina a través de plásmidos relacionados con el gen *mcr-1* (Mobile Colistin Resistance), productor de una enzima responsable de la resistencia a este antibiótico. En el estudio, se determinó la presencia de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* en 78 (15%) de 523 muestras de carne cruda, 166 (21%) de 804 muestras de animales y 16 (1%) de 1.322 muestras de pacientes hospitalizados con infección (Liu et al., 2016).

3.2.- Multirresistencia antimicrobiana

El uso de antimicrobianos, ya sea de manera terapéutica o no, expone a las bacterias patógenas y la microbiota comensal a una presión selectiva generada por el agente antimicrobiano. Esta presión puede resultar en la aparición de resistencias, o si una subpoblación de bacterias resistentes está presente, al aumento de esta (Weese et al., 2015). Debido a ello, se han generado microorganismos resistentes a múltiples fármacos, surgiendo el término de multirresistencia antimicrobiana, definida como la no susceptibilidad por lo menos a tres o más clases o familias de antimicrobianos diferentes (Magiorakos et al., 2012).

3.3.- Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana

Un antimicrobiano necesita alcanzar su diana de acción, en una concentración suficiente y durante el tiempo adecuado, para poder inhibir el crecimiento o causar la muerte bacteriana (Torres, 2012). Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos. Del mismo modo, un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica de sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos. Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición, y que la selección de estos mecanismos puede llevar al fallo terapéutico tanto a nivel de granja, como a nivel hospitalario, es importante conocer los mecanismos de resistencia más prevalentes en las bacterias Gram negativas como lo son *E. coli* y *Salmonella*.

3.3.1.- Modificación enzimática del antibiótico

Las bacterias producen enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico (Figura 1) haciendo que éste pierda su funcionalidad (Tafur JD, 2008). Las betalactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico que poseen los antibióticos de esta familia (Tafur JD, 2008). De igual forma, las enzimas modificadoras no hidrolíticas de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación (Livermore, 1991). En el caso de *Enterococcus* spp., poseen acetiltransferasas y fosforiltransferasas, enzimas bifuncionales con un perfil diferente de aminoglucósidos sobre los que actúan. La presencia de más de una enzima, dificulta su acción.

3.3.2.- Bombas de expulsión del antibiótico

Este mecanismo (Figura 1) opera tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evita que llegue a su diana. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Vila et al., 2007). Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de varios antimicrobianos. Los genes *MefA* (*Streptococcus pneumoniae*), *NorA* (*Staphylococcus aureus*) y *Mex* (*Pseudomonas aeruginosa*) explican la resistencia a macrólidos en estos patógenos (Gotoh et al., 2010) y a fluoroquinolonas.

3.3.3.- Cambios en la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria

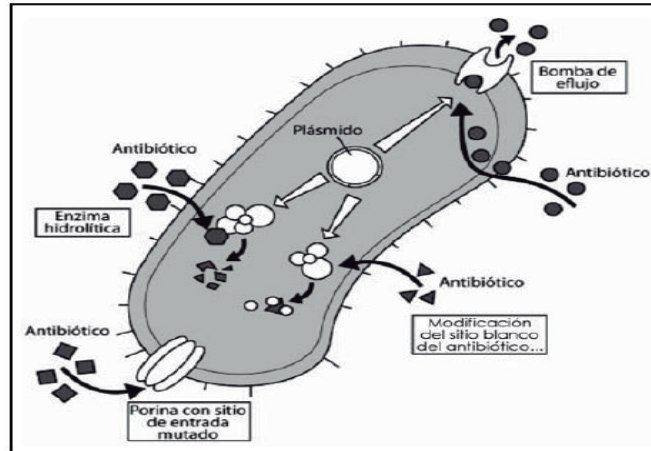
Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios

en las porinas (Figura 1). Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Vila et al., 2007). En betalactámicos y fluoroquinolonas, se produce una disminución de la susceptibilidad de estos agentes antimicrobianos en *Pseudomonas* por la disminución de la expresión de porinas (Daza-Perez, 1998).

3.3.4.- Alteraciones de las dianas del antibiótico

Las bacterias pueden alterar las dianas donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta (Figura 1). Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos betalactámicos a nivel de las PBPs (Cavaco et al., 2008b). La resistencia a metilina en *Staphylococcus* spp., a betalactámicos en *Neumococcus* spp. y *Enterococcus* spp., y en algunas bacterias Gram negativas (*Haemophilus gonococcus*), pueden ser debidas a alteraciones de PBPs.

Figura 1. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos (Moreno M., et al., 2009).



3.4.- Mecanismos de transferencia de genes de resistencia

Las bases genéticas de la adquisición de resistencias antimicrobianas son múltiples; se puede llevar a cabo por mutaciones en genes estructurales o reguladores, o adquisición de genes de resistencia (Martinez, 2006). La transferencia horizontal de genes de resistencia es el traspaso de información genética entre bacterias, proceso diferente a la replicación, y que permite variabilidad genética y evolución bacteriana (Tafur JD, 2008). Además, incrementa la capacidad de los microorganismos a adaptarse a las variaciones del medio. Las bacterias utilizan diversas vías para transferir información genética a través de procesos como conjugación, transformación o transducción (Figura 2). Estos mecanismos son el mayor determinante en la evolución bacteriana, diseminando también genes de virulencia (Kelly et al., 2009), siendo una transmisión dinámica que genera

plasticidad en los genomas, dando propiedades patogénicas a muchos agentes infecciosos, previamente inocuos (Ahmed et al., 2008).

3.4.1.- Conjugación

Proceso mediado por plásmidos, elementos conjugativos, que tienen la propiedad de transferirse de una célula a otra, gracias a un contacto cercano, entre ambas células mediante un poro de conjugación o pili sexual (von Wintersdorff et al., 2016). La conjugación, desde el punto de vista clínico es el mecanismo de transferencia horizontal de genes más importante.

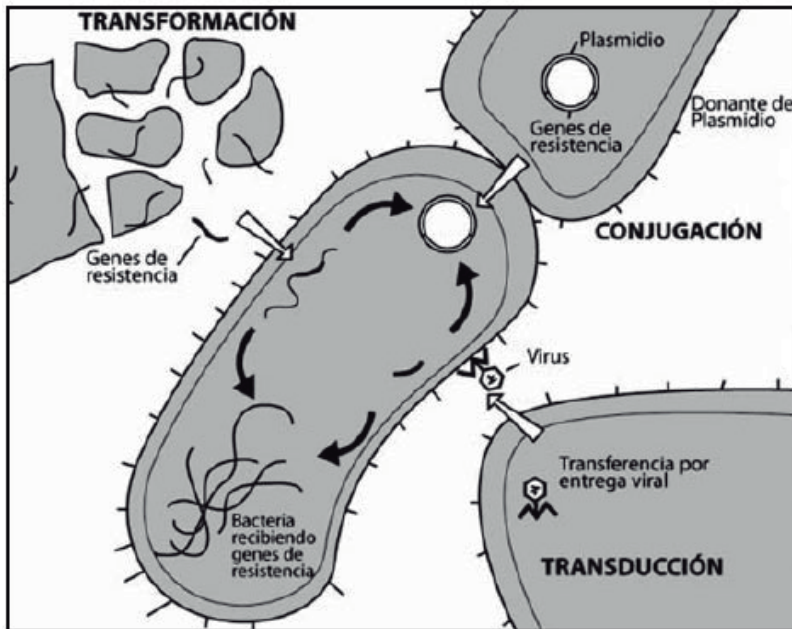
3.4.2.- Transformación

Los genes de resistencia son transferidos de una bacteria a otra como ADN “desnudo”, es decir, cuando una bacteria muere su material genético puede quedar circulando y este es captado por otras bacterias y lo incorporan en su propio ADN (von Wintersdorff et al., 2016).

3.4.3.- Transducción

Es la transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante un virus que infecta a la bacteria, llamados bacteriófagos o fagos (von Wintersdorff et al., 2016). Este virus puede integrarse en el genoma bacteriano y al transferirse a otra célula, puede llevar parte del genoma de esta bacteria y así transportar genes, entre ellos genes de resistencia antimicrobiana.

Figura 2. Mecanismos de transferencia horizontal de genes de resistencia antimicrobiana (Moreno M., et al., 2009).



3.5.- Plataformas genéticas para la movilización de genes

3.5.1.- Plásmidos

Los plásmidos (Figura 3), son elementos genéticos extra cromosómicos móviles, de forma circular presentes en organismos procariontes y en algunos eucariotes. Algunos tienen la capacidad de replicarse independientemente de la maquinaria genética de la que dispone la célula (Boot et al., 2013), lo que les da el apelativo de conjugativos y no conjugativos. Los plásmidos contienen genes que, en general, no son vitales para la bacteria (por lo cual pueden sobrevivir sin ellos), pero que le permiten tener ventajas para mantenerse en

medios adversos. Su tamaño puede variar desde un kilo base (Kb) hasta cientos de Kb, y su número también puede variar, de una copia hasta decenas por células, dependiendo del tipo de plásmido que se trate (Waters, 1999).

Los plásmidos parecen aumentar la diversidad genética bacteriana, adquisición y pérdida de genes, y se pueden intercambiar horizontalmente entre las poblaciones de bacterias por conjugación o movilización (Francia et al., 2004). Contienen genes esenciales para la iniciación y el control de genes de replicación y genes accesorios que pueden ser útiles a su huésped bacteriano, tal como genes de resistencia a antimicrobianos o genes virulencia (Amabile-Cuevas et al., 1992; Bergstrom et al., 2000; Thomas, 2000).

Su capacidad de autorreplicación y mantenimiento dentro de la bacteria hospedadora, se debe a la existencia de ciertos elementos genéticos involucrados en la replicación plasmídicas, los que se agrupan en una unidad genética llamada **replicón** (Couturier et al., 1988).

El replicón comprende una región de entre dos a tres Kb, que contiene los genes que codifican las proteínas de control de inicio de la replicación (*cop* e *Inc*), así como las proteínas involucradas en el inicio de la replicación (*rep*), y otros elementos de control como RNA antisentido y secuencias específicas de unión de las proteínas que colaboran en el inicio de la replicación (Couturier et al., 1988). Los plásmidos, además del replicón pueden contener otros genes, como genes de resistencia a los antibióticos y metales pesados, genes de degradación de compuestos recalcitrantes o los de utilización de otras fuentes de carbono y energía. Estos genes aportan ventajas selectivas

a las bacterias que los portan y les permiten colonizar nuevos nichos ecológicos (Gstalter et al., 2003).

Dada la alta diversidad de plásmidos, surgió la necesidad de ordenarlos y clasificarlos. El criterio de clasificación más empleado ha sido el basado en las características de las regiones de DNA esenciales, surgiendo el fenómeno de **incompatibilidad plasmídica (*Inc*)** (Novick, 1987). El procedimiento para la agrupación de incompatibilidad plasmídica se basa en la introducción, por conjugación o transformación, de un plásmido de un grupo *Inc* "desconocido" en una cepa que lleva un plásmido de un grupo *Inc* conocido. Si el plásmido residente se elimina en la progenie, el plásmido entrante se asigna a su mismo grupo *Inc* (Datta et al., 1971). Los plásmidos con el mismo control de la replicación son "incompatibles", mientras que los plásmidos con diferentes controles de replicación son "compatibles". Este fenómeno se observó en bacterias conjugativas, portadoras del plásmido F integrado en su cromosoma, y que no podían replicar otro plásmido F autónomo (Dubnau et al., 1968). Sobre esta base, dos plásmidos que pertenecen al mismo grupo *Inc* no se pueden propagar en la misma línea celular (Datta et al., 1983; Couturier et al., 1988). Considerando estas características, los plásmidos se agruparon en diferentes grupos de incompatibilidad (*Inc*), de forma que en cada grupo se incluyeron aquellos plásmidos que eran incompatibles.

A principio de la década de los 70, un esquema formal basando en este criterio fue descrito por Datta y Hedges (Datta et al., 1972). Este método ha sido una herramienta para trazar la difusión de plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos, y también ha servido para seguir la evolución y la propagación de plásmidos emergentes (Anderson et al., 1977). Sin

embargo en casos concretos, se ha combinado con otros métodos (Smalla et al., 2000; Haines et al., 2006), debido a la incapacidad de ciertos plásmidos para transferirse o al hecho de que algunos plásmidos no fueran portadores de marcadores seleccionables. Otro problema técnico que surgió fue la exclusión de superficie, fenómeno que impide la entrada de un segundo plásmido, y que era difícil de distinguir del propio efecto de la incompatibilidad (Couturier et al., 1988). Los problemas metodológicos de esta técnica dieron lugar a la aparición de grupos de incompatibilidad que realmente no existían. Este hecho puede observarse claramente en los plásmidos multirreplicón, ya que cuando se utiliza uno de estos plásmidos como residente en una bacteria receptora, no se elimina a un segundo plásmido que tenga un replicón igual a alguno de los que contenga el multirreplicón. De la misma manera, cambios puntuales en el inhibidor de la replicación o bien en su diana, alteran la incompatibilidad, haciendo pensar que estos replicones pertenecen a un grupo de incompatibilidad diferente. Todas estas situaciones generaron un esquema de incompatibilidad muy complicado y extenso (Couturier et al., 1988).

En 1988 Couturier *et al*, desarrollaron un nuevo método para la identificación de los principales replicones de plásmidos que circulan entre los *Enterobacteriaceae*. Este método se basó en la hibridación del DNA plasmídica específicas (Couturier et al., 1988), derivadas de diecinueve de los replicones plasmídicos más frecuentes en Enterobacterias y en *Pseudomonas*. No obstante, las hibridaciones cruzadas que enmascaran los resultados finales y que impiden discernir entre grupos filogenéticos cercanos, la existencia de plásmidos multirreplicón y la falta de sondas para

identificar todos los grupos *Inc* conocidos, además del trabajo laborioso y que requiere un gran tiempo, han sido los principales problemas de este procedimiento, lo cual ha conducido a la búsqueda de nuevos métodos de caracterización de la incompatibilidad plasmídica.

Posteriormente en 1996 Götz *et al*, desarrollaron la aplicación de la técnica de PCR en el tipado de plásmidos, ideado previamente sobre la base de secuencias publicadas, pero se limitó a los plásmidos *IncP*, *IncN*, *IncW* y *IncQ* (Götz *et al.*, 1996). Posteriores estudios avalan el desarrollo de nuevos cebados específicos para la detección de las zonas de replicación plasmídica (Carattoli *et al.*, 2005). La necesidad de rastrear los plásmidos que confieren resistencia a los medicamentos, les llevó a desarrollar un método de tipificación basado en PCRs *Inc / rep*. Para este método, se diseñaron 18 pares de cebadores para llevar a cabo 3 PCRs simples y 5 PCRs múltiples, basadas en el reconocimiento de replicones FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iγ, L / M, N, P, W, T, A / C, K, B / S, X, y, F y FIIA, representativos de los principales grupos de incompatibilidad de plásmidos que circulan entre las enterobacterias (Couturier *et al.*, 1988). También se han incluido las PCRs FrepB y FIIAs, para la detección de replicones FII, FIII, FIV, y variantes de FIV y FII de plásmidos de virulencia para *Salmonella*, respectivamente (Carattoli *et al.*, 2005). La especificidad del método fue probado en 61 plásmidos de referencia de una colección, previamente caracterizados de 20 *Salmonella enterica* de diferentes serotipos resistentes a múltiples fármacos (Pezzella *et al.*, 2004), los que fueron tipificados por la técnica de PCR *Inc / rep* (Carattoli *et al.*, 2005). Sin embargo, este método presenta algunos inconvenientes como los debidos a las variaciones en las secuencias de unión de los

cebadores fruto de la evolución que sufren los replicones. De hecho, Götz et al., (Götz et al., 1996) describen resultados negativos en el tipado del grupo *Inc* por la técnica de PCR y positivos por hibridación. Otros problemas ponen de manifiesto que la especificidad que se consigue mediante la técnica de PCR con cebadores específicos en plásmidos tipos con grupo *Inc* conocido, no se mantiene en plásmidos procedentes de cepas de campo (Carattoli et al., 2005), no pudiendo identificarse replicones divergentes o nuevos. El método más exacto para caracterizar un plásmido se basa en la determinación de la secuencia completa de DNA. Hasta la fecha, más de 800 plásmidos de Gammaproteobacterias han sido secuenciados en su totalidad, dando lugar a la identificación de nuevas familias de plásmidos ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/)). Además, más de 1.000 plásmidos de resistencia han sido tipificados y asignados a familias de plásmidos específicos por los métodos de PCR e hibridación (Carattoli, 2009).

Figura 3 Fotografía al microscopio electrónico de un pequeño plásmido bacteriano (Bennett, 2008).



3.5.2.- Transposones

Los transposones, son secuencias de DNA (doble cadena) con gran capacidad de movimiento, que pueden ser translocados entre cromosomas, o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio. Esto sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra durante la conjugación, permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas. Esto facilita la diseminación de genes de resistencia entre bacterias de muy diversos ecosistemas, provocando una expansión epidémica de la resistencia representando una seria amenaza (Torres, 2012).

3.5.3.- Integrones

Los integrones son unos sistemas tremendamente eficaces para la captación y acumulación de múltiples genes de resistencia a antibióticos. Se caracterizan por presentar una enzima que permite integrar de manera consecutiva genes en forma de casettes génicos, en su mayor parte de resistencia a antibióticos. La mayor parte de los integrones contienen más de un gen de resistencia (algunos de ellos pueden albergar más de 10), que afectan a diversas familias de antibióticos. Su expresión está regulada por distintos tipos de promotores (Saenz et al., 2010; Vinue et al., 2011). Estos integrones pueden estar incluidos en transposones y posteriormente, éstos en plásmidos conjugativos, que serán plásmidos de “multirresistencia” (Torres, 2012) con capacidad de transferirse fácilmente entre bacterias.

Existen también, otros sistemas de movilización que favorecen la diseminación de genes de resistencia, como es el caso de las **islas genómicas**,

las secuencias de inserción comunes (ISCR) (Torres, 2012). Se sabe, además, que cuanto más material genético exógeno posee una bacteria, mayor es su capacidad para seguir adquiriendo nuevo material genético, favorecido por los procesos selectivos a los que se ve sometida la bacteria. Algunos autores han denominado a este fenómeno "*capitalismo genético*" (Baquero, 2004).

4.- Genes de Resistencias

La hipótesis más aceptada durante mucho tiempo acerca del origen de muchos de estos genes de resistencia, ha sido que los propios microorganismos productores de antibióticos los poseían como mecanismos de defensa frente a estos compuestos que ellos mismos sintetizaban (Torres, 2012). En la última década, diversos grupos de investigación han demostrado que las bacterias ambientales, especialmente las procedentes del suelo, contienen una gran diversidad de genes de resistencia, algunos similares a los detectados en las bacterias patógenas y muchos otros nuevos. (D'Costa et al., 2007; Canton, 2009; Forsberg et al., 2012). Por otro lado, se han observado grandes semejanzas estructurales entre algunos antibióticos y otras moléculas que participan en el metabolismo microbiano. Por ello, es posible que algunos genes de resistencia tengan una doble función: inactivar a los antibióticos y actuar en procesos celulares como detoxificación, señalizadores en la comunicación intercelular o en procesos biosintéticos, entre otros (Baquero F, 2002; Wright, 2007). Todo esto hace pensar que el origen de los genes de resistencia es un tema mucho más complejo de lo inicialmente considerado, lo cual ha permitido iniciar nuevas líneas de investigación en este campo.

4.1.- Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas capaces de romper el anillo betalactámico e inactivar los antibióticos de esta familia (Bush, 1989), siendo las responsables de la mayor parte de los fracasos terapéuticos. Las betalactamasas son ubicuas de las bacterias Gram negativas y representan una forma importante de resistencia antimicrobiana. Se han descrito más de 200 betalactamasas diferentes (Paterson et al., 2005). Algunas son específicas para penicilinas (penicilinasas) o cefalosporinas (cefalosporinasas), mientras que otras tienen un espectro amplio de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar la mayoría de antibióticos betalactámicos. En las bacterias Gram negativas, las betalactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que las betalactamasas cromosómicas, pueden ser constitutivas o inducibles.

4.1.1.- Clasificación de las Betalactamasas

Tanto la clasificación como la nomenclatura de las betalactamasas constituyen un problema, debido a que cuando se introducía en la práctica clínica un nuevo antibiótico betalactámico, aparecía prácticamente al tiempo, una nueva betalactamasa que lo hidrolizaba, requiriendo nuevas clasificaciones y constantes actualizaciones (Bush, 1989). Es por ello que han sido propuestos numerosos esquemas de clasificación de estas enzimas.

El primero de ellos fue clasificarlas en penicilinasas y cefalosporinasas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas respectivamente. Más adelante, estas enzimas han sido clasificadas de acuerdo a su perfil de sustrato, punto isoeléctrico, peso molecular, reacción con los inhibidores y otros criterios

bioquímicos, así como por su origen cromosómico o plasmídico (Heritage et al., 1999).

En 1940 fue cuando se descubrió la primera betalactamasa por Abraham y Chain, y en 1968 el primer esquema funcional aceptado desarrollado por Sawai et al (Sawai et al., 1968), los cuales describen penicilinasas y cefalosporinasas de amplio espectro. En 1973, Richmond y Sykes (Richmond et al., 1973), realizaron una revisión meticulosa de la literatura sobre betalactamasas, presentaron un esquema de clasificación para las betalactamasas de bacterias Gram negativas, clasificando estas enzimas en cinco grupos basándose en el perfil de sustrato. Tres años más tarde Sykes y Matthew (Sykes et al., 1976) ampliaron este esquema teniendo en cuenta el punto isoeléctrico como criterio para clasificar las betalactamasas. En 1980 Ambler clasificó las betalactamasas en función de su estructura molecular en cuatro clases (de la A a la D). Asimismo, indica que las betalactamasas de las clases A, C y D tienen en su centro activo serina mientras la clase B son metaloenzimas (Ambler, 1980). Finalmente, Bush en 1989 (Bush, 1989), en un esfuerzo por actualizar la clasificación de las betalactamasas, propone una modificación del esquema de Richmond y Sykes, intentando relacionar el sustrato y los perfiles de inhibición con la estructura molecular, lo que ha constituido la base de la clasificación actual (Tabla VI) publicada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros y actualizada el 2010 nuevamente (Bush et al., 2010). Esta clasificación distingue cuatro categorías y múltiples subgrupos (Bush et al., 2010).

Tabla VI. Actualización del esquema de clasificación de betalactamasas de Bush, 1995 (Bush et al., 2010).

Grupo Bush-Jacob2009	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros 1995	Clase molecular (subclases)	Sustrato preferido	Inhibido		Características	Enzimas representativas
				A/C o TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de la bencilpenicilina; hidrólisis cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99,ACT-1, CMY-2,FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de ceftazidima y a menudo otra oxyminobetalactámicos	GC1, CMY-37
2 ^a	2 ^a	A	Penicilinas	Si	No	Mayor hidrólisis de benzylpenicilina que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas,1 ^a G cefalosporinas	Si	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilina y cefalosporina	TEM-1, TEM-2,SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactam	Si	No	Mayor hidrólisis de oxyminobetalactámicos (cefotaxime,cef tazidime,ceftria xone,cefepime, aztreona)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistencia a ac. Clavulánico, sulbactam, tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactam	No	No	Mayor hidrólisis deoxyminobetalactámicos en combinación con resistencia a ac. clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50

Grupo Bush-Jacob2009	Grupo Bush-Jacoby. Medeiros 1995	Clase molecular (subclases)	Sustrato preferido	Inhibido		Características	Enzimas representativas
				A/C o TZB ^a	EDTA		
2c	2c	A	Carbenicilina	Si	No	Aumento de hidrólisis de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina, Cefepime	Si	No	Aumento de hidrólisis de carbenicilina, cefepime, cefpiroma	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Var.	No	Aumento de hidrólisis de cloxacilina o oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de amplio espectro	Var.	No	hidrólisis de cloxacilina o oxacilina y oxymínobetalac támicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenemas	Var.	No	Hidrólisis de cloxacilina o oxacilina y carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas espectro extendido	Si	No	Hidrólisis de cefalosporinas inhibidas por ac. clavulánico pero no aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenemas	Var.	No	Incremento de hidrólisis de carbapenemas, oxymínobetalac támicos, cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3 ^a	3	B(B1)B (B3)	Carbapenemas	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro incluyendo carbapenemas pero no monobactamas	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1

Grupo Bush-Jacob2 009	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros 1995	Clase molecular (subclases)	Sustrato preferido	Inhibido		Características	Enzimas representativas
				A/C o TZB ^a	EDTA		
3b	3	B(B2)	Carbapenemas	No	Si	Preferentemente hidrólisis de carbapenemas	CphA, Sfh-1
NI	4	Desc.					

^a A/C: Acido clavulánico o TZB Tazobactam; ^b N.I: No incluido. Desc.: Desconocido. Var.: Variable

4.1.2.- *Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)*

Dentro del grupo 2 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (penicilinasas sensibles al ácido clavulánico) se encuentra el subgrupo 2be, que engloba a más de 200 betalactamasas de espectro extendido (BLEE) derivadas de genes TEM, SHV o del tipo CTX-M. Se caracterizan por generar un distinto nivel de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, recuperable en presencia del ácido clavulánico (Duyan et al., 2015). La mayoría de las BLEE, son enzimas adquiridas que hidrolizan las cefalosporinas (antimicrobianos de importancia clínica), y que son codificadas por genes del cromosoma o situados en plásmidos. La adquisición de BLEE se expresa en varios niveles, y difieren significativamente en características bioquímicas, como en la actividad contra betalactámicos específicos, por ejemplo cefotaxime, ceftazidime y aztreonam (Duyan et al., 2015). El nivel de expresión, las propiedades de una enzima, y la co-presencia de otros mecanismos de resistencia (como otras betalactamasas, flujo de salida, alteración en la permeabilidad), dan lugar a una amplia variedad de fenotipos de resistencia observadas entre los aislamientos positivos de BLEE (Bush et al., 1995;

Gniadkowski, 2008; Livermore, 2008; Naas et al., 2008). La primera cepa de BLEE fue identificada en 1983 (Knothe et al., 1983), y desde entonces se han detectado en todo el mundo. La distribución es el resultado de la expansión clonal de organismos productores o transferencia horizontal de genes BLEE en elementos genéticos móviles. En efecto, el grupo más importante clínicamente de BLEE son las enzimas codificadas por genes CTX-M, seguidas de SHV y TEM (Livermore et al., 2007; Canton et al., 2008). Ciertas enzimas OXA derivadas del grupo D también se incluyen dentro de BLEE. La producción de BLEE ha sido observada mayoritariamente en enterobacterias, primero en el ambiente hospitalario, mas tarde en hogares de ancianos, y a partir de año 2000 en la población como pacientes de ambulatorios, portadores sanos, animales enfermos y sanos y productos alimenticios, tanto de origen animal como vegetal. Las especies bacterianas productoras de BLEE más frecuentes son *E. coli* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, todas las otras especies de enterobacterias clínicamente relevantes son también comúnmente productoras de BLEE. La prevalencia de aislados positivos productores de BLEE depende de un rango de factores, incluyendo la especie bacteriana, localización geográfica, grupo de pacientes y tipo de infección; reportándose una amplia variación, en diferentes estudios realizados (Livermore, 1995; Bradford, 2001; Livermore et al., 2007; Canton et al., 2008; Carattoli, 2008).

Se ha demostrado que los genes codificantes de enzimas CTX-M detectados en plásmidos en cepas de *E. coli*, tuvieron su origen en genes procedentes del cromosoma de una bacteria del suelo, concretamente de *Kluyvera* (Cattoir et al., 2008). Algunas investigaciones ponen de manifiesto la

presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs del tipo CTX-M en heces de animales salvajes (Costa et al., 2006; Poeta et al., 2008), lo cual evidencia que otros factores, además del uso de antibióticos, pueden estar contribuyendo a la diseminación de este tipo de resistencia en algunos ecosistemas naturales. A raíz de esto, es importante introducir el concepto de co-selección, basado en conferir resistencia a un determinado antibiótico por el uso de otro antibiótico no relacionado, ya que sus genes de resistencia pueden estar localizados dentro de un mismo plásmido (Daza-Perez, 1998). Debido a esto, vemos bacterias que son resistentes a varios antibióticos a la vez, ya que sus genes de resistencia están contenidos en el mismo plásmido, el cual se expresa y transfiere su información a otras bacterias. Por ello, a veces, la restricción en el uso de un determinado antibiótico, no se traduce en la disminución en la tasa de resistencia de las bacterias a este, porque quizás se está usando otro antibiótico que co-selecciona ambas resistencias.

Por otro lado, hoy en día se sabe que se puede producir co-selección de bacterias resistentes a antibióticos por efecto de compuestos que no son de tipo antibiótico, como es el caso de los metales pesados, detergentes, biocidas, etc. (Gilbert et al., 2003; Gaze et al., 2005; Baker-Austin et al., 2006).

Desde que se puso de manifiesto la importancia de las betalactamasas, se buscaron inhibidores de estas enzimas (García de Lomas J, 1998), incluyéndose en este término diferentes compuestos químicos, entre los que destacan ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam.

Para la selección de enterobacterias resistentes (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) es requerido la utilización

de cefotaxime (o ceftriaxone) y ceftazidime que son usados como indicadores de resistencia a cefalosporinas, ya que puede haber gran diferencia en las MICs de cefotaxime (o ceftriaxone) y ceftazidime para diferenciar aislados de BLEE (Hirakata et al., 2005; Biedenbach et al., 2006; Hope et al., 2007).

4.1.3.- Betalactamasas de tipo AmpC

Cefalosporinasas de tipo *AmpC*, son betalactamasas de la clasificación de Ambler clase C y grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby- Medeiros (Bush et al., 2010). Las *AmpC* hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefoxitina y cefotetán) y, en menor medida, las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y los carbapenémicos (imipenem y meropenem). Este espectro de hidrólisis puede ampliarse y afectar además a cefalosporinas de cuarta generación (*AmpC* de espectro extendido), pero se desconoce cuál es la prevalencia y la relevancia clínica y epidemiológica de estas variantes de *AmpC*. La cloxacilina y el aztreonam, así como el ácido borónico y sus derivados (ácido fenilborónico), inhiben a las betalactamasas de tipo *AmpC*, mientras que el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam no son buenos inhibidores (Calvo J., 2011).

Las enzimas betalactamasas tipo *AmpC* se han encontrado codificadas en el cromosoma bacteriano en una amplia variedad de bacterias Gram negativas de forma natural; algunas de ellas se pueden recordar utilizando la nomenclatura AMPCES (*Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Providencia*

spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. (Indol positivo), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp.).

A fines de 1980 se identificaron los primeros aislados productores de *AmpC*, los cuales desde entonces se han observado globalmente como el resultado de diseminación clonal y transferencia horizontal de genes *AmpC* mediados por plásmidos, procedentes de productores naturales de los grupos bacterianos antes mencionados. También se ha encontrado *AmpC* mediada por plásmidos en *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp., especies que no tienen naturalmente expresión de *AmpC* cromosómico (Philippon et al., 2002; Jacoby et al., 2005).

La hiperproducción de AmpCs naturales se debe a diversos cambios genéticos y confieren resistencia de alto nivel a las cefalosporinas y combinaciones de betalactamasas inhibidores de las penicilinas. Las bacterias con *AmpC* cromosómico, bajo condiciones normales, producen esta enzima en bajas cantidades, sin alterar significativamente la sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación (Tafur, 2008). Sin embargo, pueden ocurrir mutaciones espontáneas (a una tasa de 10^{-5} a 10^{-7}) en los genes que regulan la producción de AmpC, lo cual lleva a la producción constitutiva de esta enzima, en suficiente cantidad como para hidrolizar los antibióticos antes mencionados (Livermore, 1995; Hanson et al., 1999). Debido a esto, las bacterias que ya no regulan la producción de AmpC, pueden ser seleccionadas durante la terapia con cefalosporinas de tercera generación.

Las *AmpC* plasmídicas se han descrito principalmente en algunas especies de enterobacterias (*Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *E. coli* y *Salmonella*, entre otras) con relevancia clínica y epidemiológica. La distribución de estas enzimas es mundial, habiéndose descrito en todos los continentes y con una prevalencia variable, dependiente del microorganismo, del tipo de *AmpC* plasmídica y del área geográfica. En general, la prevalencia de las *AmpC* plasmídicas suele ser relativamente baja (inferior al 2% de todas las enterobacterias), aunque al parecer existe una tendencia a incrementarse (Calvo J., 2011).

Uno de los métodos recomendados para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas tipo *AmpC* adquirido, es el método de MIC frente a cefoxitina (MIC >8 mg/L) y la combinación con ceftazidime y/o cefotaxime con MIC >1mg/L. La presencia de *AmpCs* adquirido también puede ser confirmado a través del método de PCR (Perez-Perez et al., 2002; Brolund et al., 2010). Las betalactamasas de tipo *AmpC* más frecuente y de mayor difusión son las codificadas por genes CMY-2.

4.2.- Resistencia a cefalosporinas en *E. coli* y *Salmonella* spp.

En los últimos años, la causa predominante de resistencia a las cefalosporinas en *E. coli* es la producción de plásmidos que codifican BLEE de la familia CTX-M y betalactamasas *AmpC* tipo b, también conocidas como cefalosporinasas de espectro extendido (CES), reportándose *E. coli* productoras de CES, diseminadas por todo el mundo (Hunter et al., 2010). Por otra parte, la resistencia a 3ª y 4ª generación de cefalosporinas está aumentando rápidamente en las bacterias asociadas a infecciones adquiridas en la población (Canton et al., 2008).

En España, existen estudios realizados en animales destinados al consumo humano que describen la presencia de genes tipo *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY-2} y *bla*_{SHV} en *E. coli* (Brinas et al., 2003; Brinas et al., 2005; Blanc et al., 2006; Riano et al., 2006; Blanc et al., 2008; Cortes et al., 2010), y plásmidos que contienen genes *bla*_{CMY-2}, así como las dos variantes estrechamente relacionadas *bla*_{CTX-M-9} (Blanc et al., 2006) y *bla*_{CTX-M-14}. Se han descrito en cepas de *E. coli* obtenidas de heces de animales destinados a consumo como pollos, cerdos y conejos sanos. Otros tipos de *bla*_{CTX-M} tales como *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-8} también se han descrito en pollos y cerdos (Moreno et al., 2007). En España antes del año 2004 rara vez se observó una reducción de la susceptibilidad a cefalosporinas en *E. coli* procedentes de cerdos sanos. Un aumento del 36% en la prevalencia de este tipo de cepas fue reportado por Moreno et al, en un estudio llevado a cabo durante el año 2004 (Moreno et al., 2007). Los aislados obtenidos en este estudio fueron caracterizados, encontrándose que la BLEE más frecuente de origen porcino era SHV-12 (41%) seguido por CTX-M-1 (10%), CTX-M-9 (10%) y CTX-M-14 (10 %)(Escudero et al., 2010).

Curiosamente, la prevalencia de *E. coli* productora de BLEE causantes de infecciones nosocomiales en los seres humanos en España aumentó ocho veces, de 0,5% en 2000 al 4,04% en 2006 (Díaz et al., 2010). Otro estudio de Díaz et al., destacó el aumento significativo de *E. coli* productora de SHV-12 durante el año 2006 y el importante papel que juega SHV-12 en la causa de infecciones adquiridas en la población en España. Es de notar un aumento paralelo de la prevalencia de los mismos tipos de genes de resistencia en los aislados de origen animal y humano reportado en estos dos estudios por separado.

En cuanto a *Salmonella*, los aislados que albergan BLEE han emergido en todo el mundo en el último tiempo, siendo CTX-M el grupo de genes más importante (Riano et al., 2009). Además, se ha detectado la emergencia de diferentes genes y genes CTX-M dentro de un mismo integrón clase 1 que facilita su diseminación en diferentes entornos (Sabate et al., 2002; Bonnet, 2004). Este integrón clase 1 está asociado con genes que confieren resistencia a los antimicrobianos que podrían ser utilizados ampliamente entre los animales y los seres humanos (tales como trimetoprim, sulfametoxazol o estreptomicina), y que podría ser una factor importante para la selección de *Salmonella* multirresistentes (Riano et al., 2006). Un gran número de estudios han investigado la presencia de BLEE en cepas de *Salmonella* spp. a partir de pacientes humanos (Simarro et al., 2000), pero sólo unos pocos estudios han sido llevado a cabo en aislados de animales de consumo o alimentos de origen animal (Weill et al., 2004; Hasman et al., 2005). En 1992 se reportó la primera cepa de *Salmonella* que contenía genes CTX-M-2 proveniente de Sudamérica, y más tarde este tipo de resistencia fue

reportada en otros países de diferentes continentes (Bonnet, 2004). En España en el año 2000, se reportó por primera vez la presencia de *Salmonella* que albergaba genes CTX-M-9 de muestras proveniente de pacientes humanos (Simarro et al., 2000). Antes del 2006, solo se habían reportado tres estudios llevados a cabo en Holanda, Grecia y Francia donde se detectaron cepas de *Salmonella* de origen animal con genes CTX-M-2, CTX-M-9 y CTX-M-32 respectivamente (Weill et al., 2004; Hasman et al., 2005). En el año 2006 en España, fue la primera vez que se reportó en *Salmonella* genes BLEE obtenidos de muestras fecales de animales de consumo (Riano et al., 2006). De cuatro aislados encontrados, tres fueron *Salmonella* (dos de la serovariedad Vichow y una Enteritidis) que albergaban genes CTX-M-9 incluidos en un integrón clase 1. El otro aislado (*S. Rissen*) contenía genes SHV-12 en combinación con genes TEM-1b (Riano et al., 2009). Estos aislados también albergaban genes *tet(A)*, *aadA sul1*, *sul2*, *dfrA16* que confieren resistencia a tetraciclina, estreptomicina, sulfametoxazol y trimetoprim respectivamente. Curiosamente, los aislados que presentaron genes de resistencia a estos antimicrobianos incluidos en el integrón clase 1, también contenían genes *qacEΔ1* que confieren resistencia a amonios cuaternarios que suelen usarse para la desinfección en las granjas. También se ha documentado en *Salmonella* el desarrollo de resistencia a cefalosporina a través de *AmpC* mediada por plásmidos en humanos (Folster et al., 2011) del cual, el gen más común es CMY-2. Esta misma situación se ha observado en *S. Typhimurium* aisladas de cerdos de granja que albergaban genes CMY-2. Este hallazgo sugiere que los plásmidos que albergan genes CMY-2 representan un considerable riesgo de transmisión horizontal entre animales y seres humanos (Lee et al., 2014).

Muchos estudios se han centrado en la resistencia de bacterias comensales, estas pueden actuar como marcadores de resistencia en un entorno, como potenciales vectores de genes de resistencia y como posibles patógenos oportunistas. La mayoría de los estudios realizados en animales destinados al consumo humano, han hecho hincapié en la elevada prevalencia de *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-14} encontrados en *E. coli* de origen animal, teniendo en cuenta que estas variantes también han prevalecido entre los aislados de humanos en España. Sin embargo, pocos estudios han sugerido un riesgo zoonótico transmitido por animales destinados para el consumo (Cortes et al., 2010) o animales en granja y alimentos (Mesa et al., 2006; Riano et al., 2009; Doi et al., 2010) como un reservorio de microorganismos resistentes, ya que estos microorganismos podrían extenderse a la comunidad a través de la cadena alimentaria, y por tanto contribuir en el aumento de las resistencias en la población.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios discuten el aislamiento de *E. coli* productoras de CES procedentes de animales enfermos o de animales sanos en matadero. La mayoría de los estudios se han centrado en las aves de corral (Bortolaia et al., 2010; Dierikx et al., 2010; Randall et al., 2011), mientras que un número mucho menor se ha realizado en la especie porcina (Escudero et al., 2010; Goncalves et al., 2010).

La presión selectiva por el uso de antimicrobianos para mantener cepas resistentes es un factor importante en la aparición de resistencias, ya que estudios previos han demostrado una asociación estadísticamente significativa entre el uso de ceftiofur y reducción de la susceptibilidad a las cefalosporinas de tercera generación en *E. coli* (Tragesser et al., 2006;

Jorgensen et al., 2007) sin encontrar asociación entre el uso de ceftiofur y la presencia de genes de BLEE (CTX-M). Sin embargo, la infección en animales por cepas de *Salmonella* que contienen genes BLEE y *AmpC* plasmídicos, se ha incrementado en todo el mundo, y se cree que estas bacterias surgieron en respuesta al sobre uso de ceftiofur (Gonzalez-Sanz et al., 2009; Yoo et al., 2010). También es de gran relevancia examinar otros antimicrobianos comúnmente usados en granja, que pueden co-seleccionar la resistencia a cefalosporinas.

En España, en cepas de *Salmonella* de origen porcino, se han observado altos niveles de resistencias a ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas. Estos niveles son especialmente altos en *S. Typhimurium* (89,5%). Sin embargo, las resistencias a (fluoro) quinolonas son más bajas en comparación con lo encontrado en cepas de origen avícola, pero si se comparan estos valores con otros países de Europa, dichos porcentajes son elevados. También es de destacar la resistencia a cefotaxime (5.3%) en cepas de *S. Typhimurium* de origen porcino (CReSA-MAGRAMA, 2012). De acuerdo con la Directiva 2003/99/EC de monitorización de zoonosis y agentes zoonóticos, los Estados Miembros (EM) de la UE, están obligados a notificar resistencias antimicrobianas en aislados de *Salmonella* spp. de animales destinados a consumo y en alimentos. Sin embargo la monitorización y la declaración de resistencias de organismos indicadores como *E. coli* es voluntaria (CReSA-MAGRAMA, 2012).

5.- Utilización de los antimicrobianos en la industria porcina

Los antimicrobianos en la industria porcina se utilizan principalmente de tres formas diferentes: como promotores del crecimiento, como tratamiento

profiláctico y/o metafiláctico para prevenir enfermedades y de forma terapéutica (Kempf et al., 2015). La utilización de los antimicrobianos como promotores del crecimiento fue bastante controvertida, ya que se añadían al pienso dosis bajas de antimicrobianos estructuralmente similares a los usados en humanos. Esto creó una situación idónea para la selección de bacterias resistentes y la propagación de genes de resistencia entre bacterias en el tracto intestinal de los cerdos. Muchas empresas de alimentos preparaban piensos medicamentados por orden de los agricultores sin ninguna supervisión veterinaria. Este tipo de practicas fue prohibido en la UE en el año 2006 (Maron et al., 2013).

La utilización de antimicrobianos de forma profiláctica, implica el uso de estos para la prevención de la enfermedad en animales individuales o en grupo. Se realiza cuando existe una amenaza de un brote de alguna enfermedad durante cortos períodos de tiempo, de entre 5 y 10 días. Sin embargo, existe claramente la oportunidad de utilizarlos en repetidas ocasiones durante el ciclo productivo o por períodos mucho más largos. Las concentraciones de los antimicrobianos en el alimento en forma de profilaxis son mucho mayores de las que se usaban como promotores del crecimiento y a menudo, son en concentraciones terapéuticas (Kempf et al., 2015). La utilización de antimicrobianos de forma metafiláctica implica el control de ciertas variables clínicas de grupos de animales, hasta que una de ellas, por ejemplo la temperatura, aumenta por encima de un determinado límite. En este caso, todo el lote de animales es tratado para evitar un brote de la enfermedad. Si bien, en muchos países el uso de antibióticos en el alimento de forma profiláctica/metafiláctica requiere la prescripción veterinaria, existe

una mayor gama de antimicrobianos que se pueden usar para el control de enfermedades en la industria porcina, y muchos de ellos son de importancia crítica para la salud humana. También de forma terapéutica se utiliza una amplia variedad de antimicrobianos de diferentes familias como betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas, macrólidos o aminoglucósidos (EMA, 2015). La forma de administración terapéutica en los cerdos es individual, por vía parenteral (intramuscular) u oral (alimentos). La utilización de antimicrobianos por vía oral puede ser cuestionable, ya que el ganadero no puede asegurar que el cerdo reciba la dosis requerida, ya que animales enfermos, suelen presentar por lo general inapetencia. Un estudio realizado en España (Moreno, 2014a), que recogió la opinión de varios productores de cerdos, concluyó que existe por parte de ellos, poca preocupación por los efectos nocivos sobre la salud pública en el uso de antimicrobianos en las explotaciones, muchos de ellos no eran capaces de distinguir claramente el uso terapéutico, del uso preventivo de los antimicrobianos. Siendo para ellos los antimicrobianos solo una valiosa herramienta rentable para la crianza y salud de sus animales.

En consecuencia, y para mantener la eficacia de los antimicrobianos sobretodo, los clasificados de “importancia crítica” (3ª y 4ª generación de cefalosporinas, flouroquinolonas y macrólidos), ha surgido un debate activo para tratar de restringir el uso de estos antimicrobianos de “última línea”, en medicina humana, y aplicar una prohibición total del uso de cefalosporinas en animales de granja. Para ello, es de gran importancia estudios completos realizados a nivel de granja que analicen la presencia y los factores de riesgo que pueden contribuir en la emergencia, selección y aumento de la

prevalencia de microorganismos resistentes. A raíz de esto, los objetivos planteados en esta tesis doctoral apuntan a recolectar información más precisa en relación al consumo de antimicrobianos en granjas de cerdos en enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* RC.

Si tú no entiendes que la vida está ahí para desafiarte en cada momento, tú no entiendes lo que es vivir. Si tú mismo no desafías tu vida, alguien más te va a desafiar “. Y.B.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El uso de antimicrobianos basados en programas de medicina preventiva en granjas convencionales de cerdos de engorde, y en particular, el uso de cefalosporinas de tercera generación, es un factor de riesgo asociado a la emergencia y diseminación de enterobacterias resistentes a cefalosporinas, tales como *E. coli* y *Salmonella*.

1.- Objetivo general

Evaluar si existe asociación entre las prácticas de manejo en granja de porcino relacionadas con el consumo de antimicrobianos, en particular betalactámicos, y la presencia de enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp. resistentes a cefalosporinas, antimicrobiano considerado de importancia crítica para los tratamientos infecciosos en humanos.

2.-Objetivos específicos

1.- Estimar la emergencia de cepas de *E. coli* RC en una granja convencional de porcino, en la que los animales únicamente sean tratados con dos tipos de antimicrobianos betalactámicos, ceftiofur y amoxicilina en diferentes etapas de su ciclo de vida (Estudio 1).

2.- Evaluar si el tratamiento con ceftiofur (cefalosporina de tercera generación) en lechones de siete días, es un factor de riesgo en la emergencia de cepas de *E. coli* RC en granjas de porcino convencionales (Estudios 1 y 2).

3.- Determinar la dinámica de la población de *E. coli* RC con respecto a la población total de *E. coli* durante el tratamiento con ceftiofur en granjas convencionales de porcino (Estudio 2).

4.- Evaluar si la granja es un reservorio de *E. coli* y *Salmonella* RC y determinar si los genes de resistencia a cefalosporinas son similares a aquellos que se encuentran en la población humana descritos en la literatura (Estudios 1 y 3).

5.- Determinar si los genes de resistencia a cefalosporinas son transferibles y caracterizar los plásmidos que los transfieren (Estudios 1 y 3).

6.- Determinar la presencia de cepas de *Salmonella* y *Salmonella* RC en granjas de porcino, y analizar la emergencia de cepas de *Salmonella* RC bajo diferentes tratamientos (Estudio 3).

"La vida es un flujo de amor. Solo tu participación es requerida" Y B.



ESTUDIO 1

ESTUDIO 1: Emergencia de *E. coli* RC en una granja convencional

STUDY 1: Emergence of cephalosporin resistant *E. coli* in a conventional farm.



Impact of the Use of β -Lactam Antimicrobials on the Emergence of *Escherichia coli* Isolates Resistant to Cephalosporins under Standard Pig-Rearing Conditions

Karla Cameron-Veas,^a Marc Solà-Ginés,^a Miguel A. Moreno,^{b,c} Lorenzo Fraile,^d Lourdes Migura-García^{a,e}

Centre de Recerca en Sanitat Animal, UAB-IRTA, Barcelona, Spain^a; Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^b; Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain^c; Universidad de Lleida, Departamento de Producción Animal, Lleida, Spain^d; Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Barcelona, Spain^e

(Cameron-Veas, 2015)

Abstract

The aim of this study was to evaluate if the treatments with ceftiofur and amoxicillin are risk factors for the emergence of cephalosporin resistant (CR) *E. coli* in a pig farm during the rearing period. 100 seven-day-old piglets were divided into two groups, control (n=50) and parenterally treated with ceftiofur (n=50). During the fattening period, both groups were subdivided in two. A second treatment with amoxicillin was administered in-feed to two of the groups; group 1 (untreated, n=20), group 2 (treated with amoxicillin, n=26), group 3 (treated with ceftiofur, n=20) and group 4 (treated with ceftiofur and amoxicillin, n=26). During treatment with ceftiofur faecal samples were collected before treatment (day 0) and at days 2, 7, 14, 21 and 42 post-treatment, whereas with amoxicillin, the sampling was extended 73 days post-treatment. CR *E. coli* were selected on MacConkey agar with ceftriaxone (1mg/L). PFGE, minimal inhibitory concentration to 14 antimicrobials, presence of cephalosporin resistance genes and replicon typing of plasmids were analyzed. Both treatments generated an increase in the prevalence of CR *E. coli*, which was statistically significant in the treated groups. This increase in the prevalence of CR *E. coli* diminished after treatment. A total of 47 CR *E. coli* were recovered during the study period, 15 contained *bla*_{CTX-M-1}, 10 *bla*_{CTX-M-14}, four *bla*_{CTX-M-9}, two *bla*_{CTX-M-15} and five *bla*_{SHV-12}. The treatment with ceftiofur and amoxicillin was associated to the emergence of CR *E. coli* during the course of the treatment. However, by the finishing time CR *E. coli* were not recovered from the animals.

Introduction

During the last decade, resistance to extended spectrum beta-lactams, especially third- and fourth-generation cephalosporins and penems has raised the concern of the scientific community. The World Health Organization has defined third- and fourth-generation cephalosporins as being “critically important” for use in humans (http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/index.html), since the increased presence of resistance to these antimicrobials could seriously compromise the treatment of some life threatening infections, including bacteraemia and meningitis. A third-generation cephalosporin, ceftiofur, and a fourth-generation cephalosporin, cefquinome, have been developed strictly for veterinary use (Hornish et al., 2002). Ceftiofur is widely used in many different food animals to treat respiratory diseases. Cefquinome can also be used for the treatment of mastitis metritisagalaxia syndrome in sows, exudative epidermitis, and meningitis (Collignon et al., 2007). The systemic use of cephalosporins in food animals that could potentially select for resistant organisms is worrisome due to the role that food-producing animals may play in the spread of extended spectrum cephalosporinases into the community. Previous studies have demonstrated statistically significant association between the use of ceftiofur and reduced susceptibility to third generation cephalosporins in *Escherichia coli* (Tragesser et al., 2006; Jorgensen et al., 2007). However, they did not find association between ceftiofur usage and presence of ESBL genes (*bla*_{CTX-M}) and more importantly, none of these studies have examined other drug-use practice that can cross- or co-select for cephalosporin resistance. To our understanding, there is a lack of comprehensive studies performed under standard pig rearing

conditions, analysing the presence and factors that can contribute to both, emergence and increase in occurrence of CR *E. coli* in pig farms. For this reason, this study intends to evaluate if the treatments with two different beta-lactams, ceftiofur and amoxicillin, are risk factors associated to the emergence of CR *E. coli* during two stages (preweaning-growing and finishing) of the rearing period, and assess if there is enough selective pressure to maintain resistant strains during the life-time of the animals.

Materials and methods

Study design

This study was conducted on a conventional commercial pig farm in the northeast of Spain. During the six months previous to the study the site remained depopulated, cleaned and disinfected with standard operation procedures under field conditions. Sixty eight sows were housed in the climate control house, and faecal samples were collected to examine the presence of CR *E. coli*. After farrowing, a total of 100 seven-day-old piglets from 10 different sows were spatially divided into two groups: untreated control (n=50) and parenterally treated (n=50) with ceftiofur (5 mg/Kg of body weight in one shot) following the summary of product characteristics of a commercial presentation (Naxcel®, Zoetis SLU). Three animals from the control group died of non infectious causes during the course of the study. Faecal samples were taken manually from the rectum of piglets in six occasions; before treatment (day 0) and at days 2, 7, 14, 21 and 42 post-treatment (Table 1).

During the fattening period (day 70), each of the previous groups was subdivided into two (Table 2). A treatment with amoxicillin (Maymoxi®, Laboratorios Maymó) was administered in feed for 14 days to two of the new four groups (10 mg/kg of body weight/day). At that point in time, there were a total of four groups: untreated control group, or animals that did not receive any treatment with beta-lactams (n=20); group 2, animals orally treated with amoxicillin during finishing (n=26); group 3, animals parenterally treated with ceftiofur during preweaning (n=20) and group 4, animals treated with ceftiofur and amoxicillin (n=26). The four groups remained

spatially separated until their departure to the abattoir. Faecal samples were taken from all animals before administration of amoxicillin (day 0) and on days 2, 7, 14, 21, 45 and 73 post-treatment. A final sampling was performed at slaughter time. During the course of the study, farm biosecurity was extreme. Animals of different groups were spatially separated in designated pens to avoid contact. Overboots were used and replaced at the entrance of each pen. Sampling was always initiated from the control group to the treated group to minimize transmission of resistant bacteria from pen to pen.

The study was performed in a commercial farm where the treatments, housing and husbandry conditions were conformed to the European Union (EU) Guidelines. In particular, the medicinal product used in this study (Naxcel®) is EU registered (EU/2/05/053/001), and it was used according to veterinary rules without any additional requirement. Thus, it was not necessary to comply with ethical standards and approvals to carry out this experimental work, since it did not require any invasive procedures (only collection of faecal samples), or management other than the field standards protocols set by the company.

***E. coli* isolation and identification**

Faecal samples were transported to the laboratory at 4°C on the same day of sampling. During the first two visits to the farm, a total of 268 faecal samples were collected from the sows (n=68) and the piglets (n=200) and a comparative study of isolation methods was performed. For each sample, direct plating of a loopful of homogenized faeces onto MacConkey agar with ceftriaxone (1 mg/L) was carried out in parallel to the following enrichment

method. One gram of faeces was suspended in 10 ml of MacConkey broth supplemented with ceftriaxone (1 mg/L). After overnight enrichment at 37 °C, 10µl were plated onto MacConkey agar with ceftriaxone (1 mg/L). Three colonies for each plate were stored and one was confirmed as *E. coli* by Vitek-2 (Biomerieux) and further characterized.

Pulsed field gel electrophoresis and phylotyping

To assess the clonality of the isolates and their epidemiological relatedness, all isolates were analyzed for genetic relatedness by PFGE using *Xba*I according to the CDC PulseNet protocol (Ribot et al., 2006). The *Salmonella* Braenderup H9812 strain was used as molecular standard. PFGE profiles were compared using Fingerprinting II Informatix software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Isolates were considered to have a unique pattern when at least one band difference was detected. The analysis of the bands generated was performed using the Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic averages (optimization of 1.5% and position tolerance 1.5%).

The isolates were discriminated in phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D and E) according to the method previously described by Clermont *et al.* (Clermont et al., 2000; Clermont et al., 2013).

Antimicrobial susceptibility testing

Disc diffusion was performed according to CLSI guidelines using the following discs (Oxoid, UK): ceftazidime, 30 mg; ceftazidime+clavulanic acid, 30+10 mg; cefotaxime, 30 mg; cefotaxime+clavulanic acid, 30+10 mg; and ceftazidime+clavulanic acid, 30+10 mg. The disc combinations of cefotaxime and cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime and ceftazidime/clavulanic acid were used for the identification of ESBLs; ceftazidime was used for the detection of *AmpC*-type beta-lactamase (CLSI, 2008). Minimum inhibitory concentration (MIC) against ampicillin, ciprofloxacin, nalidixic acid, gentamicin, streptomycin, tetracycline, florfenicol, colistin sulphate, sulphamethoxazole, trimethoprim, chloramphenicol, kanamycin, cefotaxime and ceftazidime was determined by microdilution methods (VetMIC GN-mo, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden). Results were interpreted as epidemiological cut-off values following EUCAST recommendations (<http://www.eucast.org/>).

Detection of resistance genes

Resistance to third-generation cephalosporins was analysed by PCR for the presence of the *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX}, *bla*_{CMY-1}, *bla*_{CMY-2} and *bla*_{SHV} genes as described previously (Hasman et al., 2005). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes was assessed by multiplex PCR (Perez-Perez et al., 2002). Sequence analysis was performed using Vector NTI advance 11 (InforMax, Inc., Bethesda, MD). The amplified nucleotide sequences were compared to previously described sequences obtained from public databases (www.ncbi.nlm.nih.gov, <http://www.lahey.org/Studies/>).

Mating experiments and plasmid characterization

Filter mating experiments were performed to assess the capacity of the plasmids to conjugate. For this analysis, fourteen isolates containing ESBL genes were selected. They comprised representative isolates from five PFGE clusters and nine PFGE types. Mating assays were performed as described elsewhere (Bielak et al., 2011), using the isolates as donors and rifampicin-resistant *E. coli* HB101 as recipient. Transconjugants were selected on LB agar plates containing rifampicin (50 mg/L) and ceftriaxone (1mg/L) and were confirmed by PFGE. Plasmidic DNA was purified from these 14 wild-type isolates and later from transformants using a Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Plasmids were introduced to electrocompetent plasmid-free *E. coli* cells by electroporation. Transformants were selected in brain heart infusion agar supplemented with ceftriaxone (1mg/L) and PCR for confirmation of the cephalosporin resistant genes was performed. The presence of a unique plasmid in the transformants and their sizes were determined using S1-PFGE (Barton et al., 1995).

Finally, plasmids were classified by PCR-based replicon typing (Carattoli et al., 2005). Additionally, susceptibility testing was performed in all transformants to assess transferability of resistance genes unrelated to cephalosporins.

Results

Emergence of cephalosporin resistance during treatment

In the first visit 168 samples were obtained (100 from piglets, 68 from sows). None of the samples were positive for CR *E. coli* by direct plating in contrast with 11 positive piglets obtained with enrichment methods. Similar results (8 positive piglets versus 16, respectively) were obtained in the second visit (n=100), furthermore, the 8 positive samples obtained by direct plating were also detected by the enrichment method. These results convinced the authors to continue the study only using the enrichment methodology.

All 68 sows were negative for CR *E. coli*. However, before administration of ceftiofur, five and seven of the seven-day-old piglets among the control and the treated groups respectively, yielded CR *E. coli* (Table 1). During this first treatment, a total of 12 (4.1%) and 23 (8%) CR *E. coli* were isolated from the control (n=288 samples) and the treated group (n=300 samples), respectively. The difference in the proportion of CR *E. coli* recovered in the two groups was statistically significant (p=0.04). The highest percentage of samples positive for CR *E. coli* was obtained within the treated group (22%), 48 hours post-treatment, showing a statistical tendency (p=0.1) when compared to the corresponding figure (10%) of the control group.

A total of 552 faecal swabs were collected during the second part of the study when animals were treated with amoxicillin in-feed (Table 2). Previously to the treatment, all animals were negative for CR *E. coli*. Two, seven, one and one CR *E. coli* were recovered from group 2 (treated only with amoxicillin) after 2, 7, 14 and 45 days post-treatment, respectively. One extra isolate was

obtained from group 4 (treated with ceftiofur and amoxicillin) after 21 days post-treatment. No other positive samples were obtained in the rest of the groups during the study period. The highest percentage of samples positive for CR *E. coli* (27%) was obtained after seven days of amoxicillin treatment, within the group treated with amoxicillin and with no previous history of ceftiofur use. Significant differences were observed (Fisher test, $p=0.02$) between the proportion of CR *E. coli* isolated from animals treated with amoxicillin and the rest of the groups after seven days of treatment. By the finishing time, all animals were negative for CR *E. coli*.

Table 1: Results obtained during the visits after treatment with ceftiofur. Sampling in day 0 was performed prior injecting the animals with ceftiofur.

Sampling days	Age (days)	Positive animals in the control group (N=50*)	Positive animals in the treated group (N=50)
0	6-8	5 (10%)	7 (12%)
2	8-10	5 (10%)	11 (26%)
7	13-15	1 (2%)	0
14	20-22	1 (2%)	5 (8%)
21	27-29	0	0
41	47-49	0	0

*three animals from the control group died after 7 days of treatment decreasing the size of the group to 47 animals.

Table 2: Results obtained during the course of the study after treatment with amoxicillin. Sampling in day 0 was performed just before the beginning of the treatment.

Sampling days	Age (days)	Positive animals in each group			
		Group 1 (N=20)	Group 2 (N=26)	Group 3 (N=20)	Group 4 (N=26)
0	70	0	0	0	0
2	72	0	2 (8%)	0	0
7	77	0	7 (27%)	0	0
14	84	0	1 (4%)	0	0
21	115	0	0	0	1 (4%)
45	138	0	1 (4%)	0	0
73	155	0	0	0	0

Group 1: untreated with antimicrobials, Group 2: untreated with ceftiofur and treated with amoxicillin, Group 3: treated with ceftiofur and not treated with amoxicillin, Group 4: treated with ceftiofur and with amoxicillin.

PFGE and phylogenetic analysis

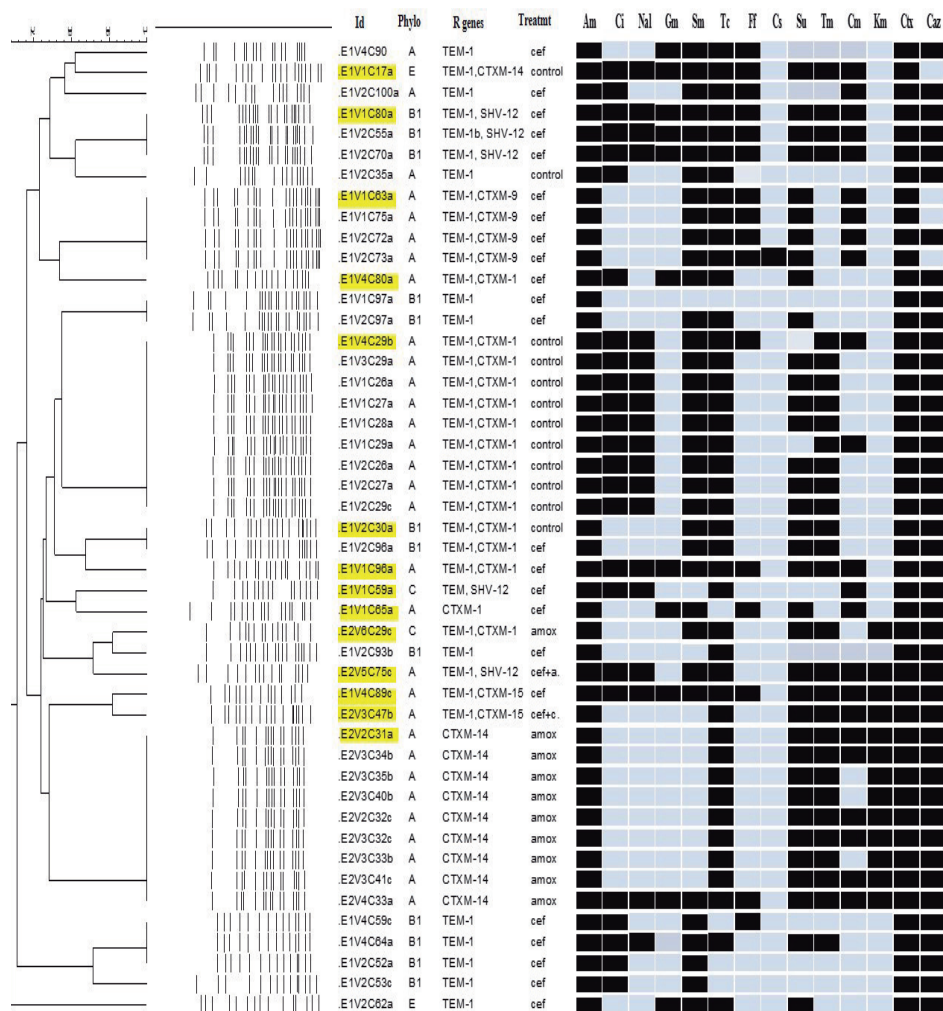
Electrophoresis of *Xba*I-digested genomic DNA from the 47 CR *E. coli* isolates revealed 22 different profiles (Fig. 1). *Xba*I profiles typically had 14 to 21 restriction fragments between 20 and 1135 kb (Fig. 1). Indistinguishable fingerprints were present in isolates from different animals, and also in isolates obtained from the same animal at different sampling times (annex 1), indicating the persistence of clones during the course of the treatment. None of the clones obtained during the treatment with ceftiofur were recovered during treatment with amoxicillin. Additionally, 10 out of 12 isolates recovered during amoxicillin treatment presented identical PFGE pattern. A total of 66%, 25%, 4% and 4% belonged to the phylogroups A, B1, C and E, respectively.

MIC determination

All 47 CR *E. coli* isolates (Figure 1) were resistant to ampicillin (WT \leq 8mg/L) and cefotaxime, (WT \leq 0.25 mg/L) and all but four (belonging to the ceftiofur study) were resistant to ceftazidime (WT \leq 0.5 mg/L). Regarding the remaining antimicrobial families tested (tetracyclines, sulphamides, trimethoprim, aminoglycosides, quinolones, phenicols and polymyxins), all isolates but two were multiresistant (Schwarz et al., 2010), ranging from resistance to three families of antimicrobials to resistance to six. MIC differences were detected among isolates according to treatment and sow. Higher levels of resistance were found during the ceftiofur treatment against phenicols (both, chloramphenicol (WT \leq 16 mg/L) and florfenicol (WT \leq 16 mg/L)) and gentamicin (WT \leq 2 mg/L) when compared to the amoxicillin treatment, whereas levels of resistance were lower against ciprofloxacin (WT

≤ 0.064 mg/L), nalidixic acid (WT ≤ 16 mg/L), trimethoprim (WT ≤ 2 mg/L), and kanamycin (WT ≤ 8 mg/L). Litter from sow number 25 had all 10 positive CR isolates but one with the same resistance phenotype (beta-lactams – quinolones - trimetophim), whereas the remaining isolates obtained from the rest of the sows exhibited higher diversity of resistance traits. One isolate was resistant to colistin (WT ≤ 2 mg/L).

Figure 1. Dendrogram showing the genotypic relatedness of the CR *E. coli* isolated during the course of the study, phylogeny, cephalosporin resistance genes, treatment and phenotypic diversity.



Am: ampicillin, Ci: ciprofloxacin, Nal: nalidixic acid, Gm: gentamicin, Sm: streptomycin, Tc: tetracycline, Ff: florfenicol, Cs: colistin, Su: Sulphametoxazole, Tm: trimethoprim, Cm: chloramphenicol, Km: kanamycin, Ctx: cefotaxime, Caz: ceftazidime. Highlighted in yellow are those strains selected for transformation and conjugation experiments

Detection of genes responsible for ESBL resistance

ESBL genes were detected in 36 of these 47 CR *E. coli* isolates, and in most cases were combined with the *bla*_{TEM-1} gene. Fifteen isolates were confirmed to contained *bla*_{CTX-M-1}, 10 *bla*_{CTX-M-14}, four *bla*_{CTX-M-9}, two *bla*_{CTX-M-15} and five *bla*_{SHV-12}. Four isolates were resistant to ceftaxime and the genotype could not be determined. Seven isolates with MIC 0.5 mg/L and 2 mg/L for cefotaxime and ceftazidime respectively, were negative for all PCRs tested, suggesting low susceptibility to cephalosporins probably by upregulation of the AmpC promoter.

Conjugation and transformation

Eight of the 14 selected isolates were able to transfer the cephalosporin resistant genes by conjugation. Additionally, 11 out of 14 isolates transferred cephalosporin resistant genes to the electrocompetent strain. The 11 transformants together with the three transconjugants resulting from the wild-type strains were subjected to S1-nuclease, and the presence of one unique plasmid was confirmed. Sizes of plasmids varied between aprox. 33.4 Kb and 173.4 Kb (Table 3). IncI1 was the most common replicon followed by IncN. Four of the isolates presented two different replicons on the same plasmid, and no replicons were detected in one of the transformants.

The transformants/transconjugants were also resistant to streptomycin (n=10), tetracycline (n=9), sulphamethosaxole (n=8), trimethoprim (n=4), ciprofloxacin (n=2), and kanamycin (n=1).

Table 3: Results of the conjugations and transformations experiments together with plasmid replicons, and plasmids sizes obtained.

<i>Inc</i> Families found									
Wild type	Resistance gene	Conjugation results	Transformation results	I1	N	FIA	FIB	A/C	Molecular weight (Kb)
E1V1C17a	CTXM-14	TC1b	TF1a	+					120
E1V1C80a	SHV-12	TC2a		+					138,9
E1V1C63a	CTXM-9	TC3b		+					138,9
E1V4C80a	CTXM-1	TC4a	TF4a		+				40
E1V4C29b	CTXM-1		TF5a		+		+		140
E1V2C30a	CTXM-1		TF6a	+					138
E1V1C96a	CTXM-1	TC7a	TF7a		+				40
E1V1C59a	SHV-12	TC8c	TF8	+	+				180
E1V1C65a	CTXM-1		TF9a		+				50
E2V6C29c	CTXM-1	TC10a	TF10a					+	180
E2V5C75c	SHV-12		TF11a						140
E1V4C89c	CTXM-15		TF12a			+	+		150
E2V3C47b	CTXM-15		TF13a			+	+		150
E2V2C31a	CTXM-14	TC14a		+					120

In bold all transconjugants and transformants used for replicon typing

Discussion

Cephalosporin resistant *E. coli* isolates were found in samples from seven-day old piglets prior receiving any medication. Moreover, we could not detect them from the sows despite using an enrichment step for isolation of the specific resistance trait. The high clonality of the isolates demonstrated by PFGE does not plead for a vertical transmission, but rather for multiple acquisitions of isolates with limited colonization properties, perhaps from an external origin (personnel working at the farm, food source, presence of rodents or other vectors). Other studies have also detected high diversity of CR isolates in newborn piglets, especially when using enrichment methods for isolation due to the ability of low-prevalent strains to overgrow high-prevalent strains during enrichment (Hansen et al., 2014). Additionally, weaning poses enough stress that may contribute to *E. coli* overgrowth in pigs (Looft et al., 2012a; Stecher et al., 2013). On the other hand, in some cases, PFGE results suggest that some of the clones were shared among piglets of the same pen (like the litters from sows numbers 25 and 11), indicating a common source within the pen. Several studies have demonstrated a short-lived increase in the *E. coli* population after antimicrobial treatment or a stressful event. Since the sows were far from these events, they may carry undetectable amounts of CR *E. coli* (Looft et al., 2012a; Stecher et al., 2013), and the limitation of the bacteriological techniques did not allow their detection. Hence, the farm was cleaned and depopulated during the six months previous to the study; incorrect cleaning and disinfection of the premises may play a role in the persistence of these organisms. Since environmental samples of the barn were not taken prior the study, this option cannot be ruled out. Thus, a further visit to this farm, after

one year of finishing this trial and applying a cleaning and disinfection protocol, demonstrated the presence of CTX-M producing *E. coli* in the environment with a different PFGE profile to the ones isolated from faeces (data not shown).

After 48 hours of the parenteral treatment with ceftiofur, an increase in the prevalence of CR *E. coli* was detected. These levels decreased after the first week of treatment. In the case of in-feed amoxicillin treatment, similar increase was observed after seven days of treatment. In the last visit, prior departure to the abattoir, all the animals were negative for CR *E. coli*. Results from this study are in agreement with other studies performed in calves (Jiang et al., 2006; Singer et al., 2008), in which CR *E. coli* emerged for short time while treatment was in course, and diminished shortly after treatment. Perhaps the resistant population could not compete well with the sensitive population after withdrawal of the antibiotic (Jiang et al., 2006). However, during treatment with beta-lactam antimicrobials, animal faeces could become a source of resistant bacteria. Biosecurity measures should be undertaken during treatment, such as faeces removal or isolation of animals under medication to avoid transfer of resistance. Additionally, farmers are at potential risk of contamination during exposure to animals shedding CR bacteria. Studies have demonstrated that ESBL genes and plasmids obtained from *E. coli* of farmers, exhibited genetic similarity to those obtained from *E. coli* isolated from animals belonging to their farms (Dierikx et al., 2013).

It appears that both treatments with beta-lactams have selected for a wide range of cephalosporin resistance genes from different families, and these genes were recovered during both treatments. Previous studies analyzing

the presence of cephalosporin resistance genes in pig farms in Spain, described the presence of different *bla* genes with SHV-12 being the most frequent (Escudero et al., 2010), a completely different picture to other European countries where SHV-12 is associated to human infections (Canton et al., 2008). Results from this study have shown the co-existence of many different resistant genes within one farm. The most frequent CTX-M variants in ESBL producers in animals and food of animal origin are currently CTX-M-1 and CTX-M-14, while CTX-M-15 ESBL-producing *E. coli* have only exceptionally been observed in the veterinary context (Ewers et al., 2010). However, this study has demonstrated the presence of CTX-M-15 genes in healthy pigs harboured in high molecular weight plasmids of aprox. 150 Kb containing two replicons; FIA and FIB. Are we seeing a similar change in the evolution of resistance than we have perceived in the human side (Livermore et al., 2007), where it was a shift in occurrence from CTX-M-14 and CTX-M-1 towards CTX-M-15?

Transformation experiments and replicon typing revealed the presence of a great variety of plasmids of many different sizes harbouring the same resistant genes, with the most common replicons being *IncI1* and *IncN*. However, further studies should be performed at the animal level and at the farm level to assess both, the occurrence and spread of plasmids within the pig bacterial population in a particular farm, and the persistence and transmission of these plasmids from herd to herd.

Additionally, CR *E. coli* recovered during the course of the study were phenotypically resistant to different families of antimicrobials and half of them were resistant to ciprofloxacin, even though fluoroquinolones were

never used to treat these animals. These results are in line with a high background of antibiotic resistance genes in the gut bacteria of livestock after over 60 years of antibiotic use (Davies et al., 2010). Although fluoroquinolone resistance is mostly conferred via *gyrA/parC* mutation in the bacterial chromosome, two of the transformants exhibited resistance to fluoroquinolones. Plasmid mediated quinolone resistance has been in some cases associated to the same plasmids as those harbouring cephalosporin resistance genes (Briales et al., 2012). Furthermore, as demonstrated by the phenotype of the transformants exhibiting resistance to several antimicrobial families, co-selection by plasmids bearing resistance genes for different antimicrobial families probably plays an important role in the maintenance of resistance mechanisms as demonstrated via metagenomics in the gut bacteria of swine (Looft et al., 2012b). In depth studies should be performed to avoid the transmission of these resistance genes from farm to fork, since several studies have demonstrated the presence of resistant *E. coli* and in particular CR *E. coli* of pig origin in the abattoir (Geser et al., 2011; Agerso et al., 2012; Ramos et al., 2013b). Although animals from this study departed to the abattoir free of CR *E. coli*, it should be notice that this study was conducted under control conditions and no extra-medication apart from ceftiofur and amoxicillin was applied during the course of the study. However, conventional farming could also require the administration of macrolides, polymyxins and tetracyclines during the fattening period, which could co-select for CR *E. coli* (Callens et al., 2012; Moreno, 2014c). Nowadays, there are a scarce data linking antimicrobial consumption in veterinary medicine and the generation of antimicrobial resistance bacteria; hence, it seems clear that the use of different families of antimicrobials in the same

population could be a risk factor for the development of antimicrobial resistance in several microorganisms under field conditions (Davies et al., 2010; Garcia Migura et al., 2014).

Taken together these results suggest that the use of ceftiofur and amoxicillin at different stages of the rearing cycle are independent risk factors for the selection of CR *E. coli*. Both beta-lactam antimicrobials do select for resistant *E. coli* during the course of the treatment. However, CR *E. coli* were not detected in the absence of the selective pressure and or when the animals departed to the abattoir. Further studies should be designed to identify other risk factors associated to the persistence of resistance determinants to minimize the recirculation of isolates and/or plasmids within farms.

“Cuando entiendes quién eres y lo que eres, tu radiancia se proyecta en la radiancia universal y todo a tu alrededor se vuelve creativo y lleno de oportunidades.”Y.B



ESTUDIO 2

ESTUDIO 2: Factores de riesgo asociados a la presencia de *E. coli* RC

STUDY 2: Risk factors associated to the presence of CR *E. coli* in intensive farms

The Veterinary Journal 211 (2016) 21–25



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvjl

Shedding of cephalosporin resistant *Escherichia coli* in pigs from conventional farms after early treatment with antimicrobials

Karla Cameron-Veas ^a, Miguel A. Moreno ^{b,c}, Lorenzo Fraile ^d, Lourdes Migura-Garcia ^{a,*}

^a Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) – Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Campus UAB, 08193 Barcelona, Spain

^b Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^c Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^d Departamento de Producción Animal, Universidad de Lleida, 25003 Lleida, Spain

(Cameron-Veas et al., 2016)

Abstract

This study assesses the dynamics of cephalosporin resistant (CR) *E. coli* populations during the life cycle of pigs treated early in life with ceftiofur or tulathromycin. The study was conducted at eight conventional pig farms; four for each treatment with ceftiofur or tulathromycin. At each farm, 70 7-day-old piglets were divided into two groups; a control group ($n = 30$) and a treatment group ($n = 40$). Faecal samples were taken at day 0 (before medication), 2, 7 and 180 days post-treatment. Sows were also sampled at day 0. CR *E. coli* were selected on MacConkey agar with ceftriaxone. In five of the eight farms, 7-day-old piglets excreted CR *E. coli* before treatment. This was associated with the presence of CR *E. coli* in sows. The occurrence of CR *E. coli* positive animals decreased with increasing piglet age. The remaining three farms were negative for CR *E. coli* during the study period. Results demonstrated great variability in the frequency of CR *E. coli* positive animals between farms, independently of the applied treatment. Treatment with ceftiofur resulted in a transitory increase in the counts of CR *E. coli* forty-eight hours after beginning it. However, other risk factors such as the presence of CR *E. coli* in sows and animal age played a more relevant role in shedding of CR *E. coli* than antimicrobial treatment. Accordingly, intervention strategies targeting sows would likely have a beneficial effect in reducing the occurrence of antimicrobial resistance in pig production.

Introduction

One of the negative consequences of the extensive use of antimicrobials in veterinary medicine is the appearance of bacteria resistant to antimicrobials in food producing animals. In particular resistance to 3rd and 4th generation cephalosporins has increased over recent decades (Guardabassi, 2013). These drugs have been classified by the World Health Organization and the World Organisation for Animal Health as critically important in both human and veterinary medicine (Collignon et al., 2009). Ceftiofur and cefquinome, a 3rd and 4th generation cephalosporin, respectively, are licensed to treat food producing animals. Attempts have been made to quantify the contribution of resistant isolates causing human infections derived from food producing animals (Collignon et al., 2013) estimated that the used of antimicrobial drugs including cephalosporins used in poultry production have caused approximately 1,518 human deaths in Europe over a one year-period. However, this number is questionable since the authors did not consider other potential sources of spread of antimicrobial resistant bacteria into the community. Although the use of antimicrobials in veterinary medicine is decreasing significantly across Europe due to the application of new programs (Schwarz et al., 2001; Garcia Migura et al., 2014), there are many differences in antibiotic policy for treating animals in Europe. In the pig industry, antimicrobials are usually administered via feed or by water for metaphylaxis, which implies treatment of both sick and healthy animals (Burow et al., 2014). Additionally, other practices such as prophylaxis to prevent infection in specific risk situations (e.g., transportation in limited spaces) are ongoing (Laxminarayan et al., 2013). Although some countries such as Denmark have forbidden prophylactic use of antimicrobials, in other

European countries it is common practice to administer prophylactic antimicrobials such as ceftiofur, to piglets during the suckling period (Jorgensen et al., 2007; Callens et al., 2012, L. Fraile, personal communication). In Spain, beta-lactam antimicrobials (penicillins and cephalosporins) and macrolides (tulathromycin and tildipirosin) are the most commonly prescribed drugs during the suckling period (L. Fraile, personal communication).

The first step to control the emergence of antimicrobial resistance (AR) is to properly assess the selection pressure exerted by the use of these antimicrobials (Callens et al., 2012). In this context, the aim of this study was (i) to evaluate if treatment with ceftiofur is a risk factor for the emergence of cephalosporin resistant *Escherichia coli* (CR *E. coli*) during the nursing period in conventional pig farms, and (ii) to assess if these farms are a reservoir of resistant bacteria that can persist and enter the food chain. Since tulathromycin is also administered for prophylaxis in some conventional farms, a third aim was to determine if treatment of suckling piglets with this macrolide is a risk factor for the emergence of CR *E. coli* due to the presence of co-resistance between different antimicrobial families. With the objective of analyzing the dynamics of the CR *E. coli* population, faecal counts of CR *E. coli* in individual pigs receiving different treatments were monitored during medication and before slaughter.

Materials and methods

Study design

This study was performed in eight conventional farms located in the Northeast of Spain (Catalonia region). Inclusion criteria for the selection of these farms were the use of the same antimicrobials during the rearing cycle, no history of ceftiofur in the preceding two years and use of the same nutritional program, except for Farm 1, which used a different antimicrobial combination (Table 1). Seven of the eight farms belonged to a large farm integration system, with two different sources of gilts (designated as “A” and “B”) to maintain the breeding herd and piglet production (Table 1). The sampling period commenced in November 2012 and finished in May 2014. On each farm, seven sows in the last week of gestation were randomly selected and spatially separated in different farrowing rooms. After farrowing litters were randomly allocated as “treated” or “untreated” and 70 seven-day-old offspring (10 per mother) were randomly selected and ear tagged in both ears for identification. On each farm, piglets were divided into two groups; a control ($n = 30$) and a treated group ($n = 40$). The groups remained separated over the study period including during transportation of animals to the finishing farm, except for Farm 2 that presented a farrow to finish cycle. In four of the farms (Table 1), the treated group received 5 mg of ceftiofur/kg of body weight (bw) in one single intramuscular injection (Naxcel®, Zoetis Spain S.L.U), whereas in the other four farms, the treated groups were administered 2.5 mg of tulathromycin/kg of bw in one single intramuscular injection (Draxxin®, Zoetis Spain S.L.U). Pigs were fed using a standard nutritional program set by the companies, which included use of

different prophylactic antimicrobials during the nursery period (Table 1). This treatment commenced after the administration of ceftiofur or tulathromycin (from 21 to 70 days of age). In five farms sows received a treatment of 20 mg of oxytetracycline/kg of bw/day in feed during the last two weeks of the gestation period (Table 1).

Seven-day-old piglets were individually swabbed and faecal content was collected into a sterile tube before treatment with ceftiofur or tulathromycin on day 0. Further samples were collected on days 2 and 7 post-treatment. On day 0, faecal samples were also collected from the mothers. A final sampling was performed before the animals departed to the slaughterhouse to determine the presence of resistant bacteria (at approximately 180 days of life). Sampling points were selected based on a previous longitudinal study performed by our research group (Cameron-Veas et al., 2015) that demonstrated a significant increase in the selection of CR *E. coli* 48 h after ceftiofur treatment. During the course of the study, a total of 164 animals were not sampled at some point due to either death or loss of ear tags. Of those, 23 belonged to Farm 8 and were sent to the abattoir before they could be sampled.

Table 1: Farm characteristics in terms of production type, origin of sows, type of pen, usage of antimicrobials and treatment administered during the study of conventional pig farms in Catalonia, Spain from November 2012 to May 2014.

Farm	Origin of sows	Production	Treatment of sows (oxytetracycline) [†]	Type of pen	Antimicrobials orally administered in-feed to piglets during the rearing period (mg of antibiotic/kg of body weight/day)			Piglet experimental treatment
					Pre-starter (21 to 35 days postpartum)	Starter 1 (35 to 49 days postpartum)	Starter 2 (49 to 70 days postpartum)	
1*	Unknown	Phase 1	No	Open	15 mg of amoxicillin (Zoobiotic Globulit [®] , Laboratorios Calier SA), 5 mg of colistin sulphate (Laboratorios Andersen SA)			Tulathromycin
2	A	Farrow to finish	Yes	Open		10 mg of apramycin (Apralan [®] Laboratorios Elanco SA), 4 mg of tiamulin (Nemutin Premix, SP (Nemutin Premix, SP Veterinaria SA), 20 mg of oxytetracycline (Oxiteetraciclina Maymó, Laboratorios Maymó SA)		Ceftiofur
3	B	Phase 1/2	Yes	Boxes	15 mg of amoxicillin (Zoobiotic Globulit [®] , Laboratorios Calier SA), 10 mg of apramycin (Apralan [®] Laboratorios Elanco SA), 4 mg of tiamulin (Nemutin Premix, SP (Nemutin Premix, SP Veterinaria SA), 20 mg of oxytetracycline (Oxiteetraciclina Maymó, Laboratorios Maymó SA)			Tulathromycin
4	B	Phase 1/2	No	Open		4 mg of tiamulin (Nemutin Premix, SP Veterinaria SA), 20 mg of oxytetracycline (Oxiteetraciclina Maymó, Laboratorios Maymó SA)		Ceftiofur
5	B	Phase 1/2	Yes	Open	Laboratorios Calier SA), 10 mg of apramycin (Apralan [®] Laboratorios Elanco SA),			Ceftiofur
6	A	Phase 1	No	Open		20 mg of oxytetracycline (Oxiteetraciclina Maymó, Laboratorios Maymó SA)		Tulathromycin
7	A	Phase 1	Yes	Open	Laboratorios Elanco SA),			Tulathromycin
8	B	Phase 1	Yes	Boxes	Laboratorios Maymó, Laboratorios Maymó SA)			Ceftiofur

Phase 1/2 = phase 1 and 2, Phase 1= up to 6 kg piglet, Phase 2= up to 20 kg of body weight. *Farm 1 belonged to a different integration company. †20 mg of oxytetracycline/kg of bw/day in feed during the last two weeks of the gestation period

Isolation, identification and quantification of *E. coli*

Faecal samples were transported at 4 °C on the day of sampling to the laboratory after which a primary culture was performed by plating a loopful of homogenized faeces on MacConkey agar supplemented with ceftriaxone (1mg/L), followed by overnight incubation at 45 °C. With the aim of measuring changes in the resistant population before, during treatment and at the end of the rearing period, enumeration of CR *E. coli* was performed in all samples positive for CR *E. coli* in the primary culture. For quantification of CR coliforms, 1g of homogenised faeces was suspended in 9 mL of Phosphate Buffer Saline (PBS), followed by serial 10 fold dilutions (from 10⁻¹ to 10⁻⁶). Dilutions of 10⁻¹ - 10⁻³ were plated on MacConkey agar supplemented with ceftriaxone (1mg/L). Dilutions of 10⁻⁴ - 10⁻⁶ were plated on MacConkey agar without antibiotics to account for the total *E. coli* population. Only lactose positive colonies were counted. *E. coli* isolates were selected based on colony morphology. Three isolates were frozen per positive sample and one was confirmed to be *E. coli* by PCR methods (Heininger et al., 1999).

Statistical analyses

All statistical analyses were carried out using the SAS System V.9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Individual pigs were used as the experimental unit unless the farm was the experimental unit as detailed below. Analyses took into account that a pig was sampled several times (repeated measures) as well as the cluster effect due to the sow. The significance level (*P*) was set at 0.05 with statistical tendency reported when $P \leq 0.10$. Pigs were classified as CR *E. coli* positive if they had at least one isolate phenotypically confirmed.

Farms were classified as CR *E. coli* positive if they had one positive animal during the study period. The total *E. coli* and CR *E. coli* counts were expressed as colony formation units per gram of faeces (CFU/g) and analyzed as decimal logarithms.

Different statistical analyses were performed with the data obtained from this study. The first one comprised descriptive statistics based on contingency tables (χ^2) to evaluate at farm level the relationship between a piglet being positive for CR *E. coli* before antimicrobial treatment and four of the following nominal variables: farm, origin of the sows (A or B), sow facilities (open pen or boxes) and antimicrobial treatment given to the sows (use or no use of oxytetracycline). Proportions of pigs shedding CR *E. coli* were estimated for each sampling point on each farm, and the proportion of pigs changing carriage status between different sampling times was calculated and compared using a χ^2 test.

An exact logistic regression was used to calculate the probability of a pig to be colonized with CR *E. coli* at the time of slaughter. A variable was defined to indicate the presence or absence (1 and 0 respectively) of CR *E. coli* in each animal at slaughter time. This variable was used as a response variable to establish the effect of the different covariates defined as: positivity of the sow at the first sampling time and the antibiotic treatment applied to the piglets. For this analysis, the litter effect (hierarchical structure) was accounted for as a random effect.

Mean logs of positive CR *E. coli* counts per farm (1 to 8), antibiotic treatment (control, ceftiofur and tulathromycin) and sampling times (0, 2, 7, and 180

days post-treatment) were calculated and compared using a parametric analysis (ANOVA test). Furthermore, a final statistical model analyzed the dynamics of the mean counts of CR *E. coli* in piglets depending of the farm, piglets' age and antimicrobial treatment using a zero-inflated negative binomial regression model. An interaction term between piglets-age group and farm was included to assess if counts differed between age groups in different farms. This model took into account the hierarchical structure and the repeated measure effect of sampling the same animals at different points in time.

Results

Presence of CR *E. coli*

The occurrence of CR *E. coli* was extremely variable among farms, ranging between 0% and 93% of animals positive for CR *E. coli* (Table 2). Detection of CR *E. coli* showed a statistical tendency to be positive in sows descending from gilts of A origin compared to B origin sows ($P = 0.10$), and in sows allocated in pens rather than in boxes ($P = 0.10$). In all farms where sows were shedding CR *E. coli* offspring were also excreting CR *E. coli* before any treatment was administered. In three of the farms where CR *E. coli* were not detected in any of the sows, they were also not detected in their progeny. The detection of positive CR *E. coli* piglets before treatment was significantly associated with the presence of positive CR *E. coli* sows at a farm level ($P = 0.02$). The detection of positive CR *E. coli* in sows was not associated with the administration of oxytetracycline ($P > 0.05$) during the gestation period (Table 4).

Overall, there were no significant differences in the proportions of animals shedding CR *E. coli* between control and treated groups (ceftiofur or tulathromycin) throughout the trial ($P > 0.05$), except on two occasions. In Farm 2 (Table 2), the proportion of animals shedding CR *E. coli* in the group treated with ceftiofur before slaughter, was significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). For Farm 1, the proportion of animals shedding CR *E. coli* in the group treated with tulathromycin was significantly higher ($P < 0.05$) than in the control group at 0, 2 and 7 days post-treatment. Interestingly, CR *E. coli* could not be isolated from Farm 1 pigs at the end of the study period.

The isolation of CR *E. coli* decreased significantly ($P < 0.05$) with the age of the animals in all of the studied farms positive for CR *E. coli* from the first week of life (sampling 0, 2 and 7 days post-antibiotic treatment) to the last sampling point (previous to slaughter). No significant increase was observed in the proportion of piglets positive for CR *E. coli* during the first week after use of ceftiofur or tulathromycin. The presence of CR *E. coli* in pigs before slaughter was observed only in three of the eight farms, with 48%, 37% and 22% of animals positive for CR *E. coli*. In these three farms, the proportion of piglets with CR *E. coli* before applying any antimicrobial treatment was higher than 67%.

The logistic regression analysis demonstrated that pigs were more likely to be positive for CR *E. coli* at slaughter if they had been positive as piglets during the first week of life (odds ratio (OR) = 3.5, 95% confidence interval [CI] 1.6-8.4; $P = 0.001$) and if their mothers were positive for CR *E. coli* (OR = 4.9, 95% CI 2.02-13.9; $P = 0.0002$). Antibiotic treatment administered to

piglets did not increase the odds ($P > 0.05$) of being CR *E. coli* positive at slaughter (Table 4).

Table 2. Percentage of animals (sows, piglets and finishers) per farm from the treated and control groups shedding CR *E. coli* during each of the sampling times

Farm	Treatment	Positive Sows	Day 0 prior treatment		2 days post-treatment		7 days post-treatment		Departure to abattoir	
			Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
1	Tulathromycin	5/7	5/30 (17%)	30/40 (75%)	9/30 (30%)	26/40 (65%)	2/28 (7%)	32/39 (82%)	0/23	0/35
2	Ceftiofur	7/7	28/30 (93%)	37/40 (93%)	27/30 (90%)	36/40 (90%)	23/30 (77%)	34/38 (89%)	1/21 (5%)	18/30 (60%)
3	Tulathromycin	0/7	0/30	0/40	0/30	0/40	0/30	0/40	0/24	0/36
4	Ceftiofur	6/7	22/29 (76%)	27/39 (69%)	22/29 (76%)	31/39 (79%)	25/29 (86%)	32/39 (82%)	0/17	0/35
5	Ceftiofur	0/7	0/30	0/40	0/30	0/40	0/26	0/37	0/17	0/33
6	Tulathromycin	5/7	21/30 (70%)	32/40 (80%)	27/30 (90%)	32/40 (80%)	23/30 (77%)	30/40 (75%)	5/24 (21%)	8/34 (24%)
7	Tulathromycin	6/7	26/30 (87%)	21/40 (53%)	24/30 (80%)	31/40 (78%)	23/30 (77%)	28/40 (70%)	8/16 (50%)	14/30 (47%)
8	Ceftiofur	0/7	0/29	0/37	0/29	0/36	0/23	0/33	0/0*	0/21

*animals from the control group were not present in the farm at this sampling time

Faecal counts of CR *E. coli*

The counts of CR *E. coli* (Table 3) were significantly different among farms ($P < 0.05$) at days 2 and 7 post-treatment, and showed a statistical tendency ($P = 0.09$) at the slaughterhouse.

Similar results were observed for total *E. coli* population counts. Counts of CR *E. coli* at days 2 and 7 post-treatment were significantly higher ($P < 0.05$) in animals treated with ceftiofur than in animals treated with tulathromycin or in animals from the control group. For the total *E. coli* population, a significant increase in counts was observed in CR *E. coli* positive piglets only after two days post-treatment ($P < 0.05$). Finally, CR *E. coli* counts obtained from animals prior to departure to the slaughterhouse were significantly lower ($P < 0.05$) than those obtained during the first week of life.

When the dynamics of the mean counts of CR *E. coli* in piglets were analyzed by a zero-inflated negative binomial regression model, taking into account all variables, the counts of CR *E. coli* was significantly associated ($P < 0.05$) with farm (very variable among farms) and the age of the animals; how older the animal, how lower the counts of CR *E. coli*. There was a significant interaction ($P < 0.05$) between the piglets' age and the antibiotic treatment received during the first week of life; thus, the treatment with ceftiofur increased the counts of CR *E. coli* in positive animals during this short period of time after treatment. Finally, there was also a significant interaction ($P < 0.05$) between the farm and the age of the piglet, meaning that the variation in counts at each sampling time differed depending on the farm (Table 4).

Table 3. Mean of log counts (natural logarithm) of faecal CR E. coli per farm, groups (treated and control) and sampling time

Farm	Treatment	Day 0 prior treatment		48h post-treatment		7 days post-treatment		Departure to abattoir		
		Positive Sows	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
1	Tulathromycin	5/7	4.77 (5)	4.52 (30)	4.17 (9)	3.69 (26)	4.42 (2)	4.43 (32)	-	-
	Ceftiofur	7/7	5.50 (28)	4.87 (37)	5.51 (27)	6.28 (36)	5.85 (23)	6.22(34)	3.35 (1)	3.16(18)
4	Ceftiofur	6/7	4.28(22)	4.43 (27)	4.49 (22)	4.65 (31)	4.90 (25)	5.51 (32)	-	-
	Tulathromycin	5/7	5.50 (21)	5.18 (32)	5.50 (27)	5.12(32)	4.74 (23)	4.28 (30)	3.34 (5)	3.13 (8)
7	Tulathromycin	6/7	5.44 (26)	4.81 (21)	4.94 (24)	4.89 (31)	4.68 (23)	4.76 (28)	3.80 (8)	3.97 (14)

*Farms 3, 5 and 8 were negative for CR E. Coli. In brackets, number of CR E. coli positive samples with valid counts

Table 4. Summary of the main statistical analyses carried out in this research work.

The relationship between a piglet being positive for CR <i>E. coli</i> before antimicrobial treatment			
Variables	Significant	P value	Observation
Farm	Yes	$P = 0.02$	-
Origin of sows (A or B)	Statistical tendency	$P = 0.10$	-
Sow facilities (open pen or boxes)	Statistical tendency	$P = 0.10$	-
Treatment with oxytetracyclin during the gestation period	No	$P > 0.05$	-
The probability of a pig to be colonized with CR <i>E. coli</i> at the time of slaughter			
Variables	Significant	P value	Odds ratio and 95% confidence interval
Positivity of the sow at first sampling time	Yes	$P = 0.0002$	4.9 (2.02-13.9)
Positivity of the piglet during the first week of life	Yes	$P = 0.001$	3.5 (1.6-8.4)
Antimicrobial treatment to piglets	No	$P > 0.05$	NA
The dynamics of counts of CR <i>E. coli</i> in piglets during the whole rearing period			
Variables	Significant	P value	Observation
Farm	Yes	$P = 0.01$	-
Age of the piglets	Yes	$P = 0.02$	Significant interaction between the age of the piglet and the farm
Antimicrobial treatment to piglets	No	$P > 0.05$	Significant interaction between the age of the piglet and the antibiotic treatment during the first week of life

Discussion

Antimicrobial resistance is a complex subject, and there are limited studies describing the relationship between antibiotic treatment and resistance over time (Mathew et al., 2005). Most AR studies are designed to associate the effect of antimicrobial treatments in a cross-sectional manner (Jorgensen et al., 2007; Cavaco et al., 2008a; Agero et al., 2012). These studies measured the presence of AR and tried to associate it with use of a particular antimicrobial without considering the age of the animals sampled, or the different management practices of each farm (e.g. nutritional programs, breeding sources, etc) that may influence the final outcome. Our study has demonstrated that in farms where sows were free of CR *E. coli* the administration of ceftiofur to seven-day-old piglets did not seem to pose sufficient selection pressure to select for ceftiofur resistant organisms. However, those farms with piglets initially shedding CR *E. coli* at day 0, did experience an increase in the percentage of animals excreting CR *E. coli* during pre-weaning, independently of the treatment. By the end of the life cycle the proportion shedding CR *E. coli* had decreased. It appears that the initial load of resistant bacteria depends mainly on the farm and that there is a time effect that reduces the proportion of animals positive for CR *E. coli* as well as the counts of CR *E. coli* in individual animals. Similar dynamics have been described for CR *E. coli* in other studies (Jorgensen et al., 2007; Singer et al., 2008; Cameron-Veas et al., 2015), and may be explained by changes in the composition of the intestinal microbiota of pigs over time (Katouli et al., 1995; Hansen et al., 2013; Hansen et al., 2014).

It remains unclear why Farm 1 has such a distribution of CR *E. coli* positive animals with highest proportions of CR *E. coli* in the tulathromycin treated group from day 0 and increasing proportions up to day seven. We could not find a plausible explanation, since the sows were selected randomly. A recent study suggested that there is a reduction in prevalence and diversity of CR *E. coli* strains after weaning (Hansen et al., 2014), and results from our study may reflect similar dynamics. Additionally, differences in sow origin or management such as the use of colistin on this farm, may account for the difference observed in comparison with the other farms. However, counts of CR *E. coli* did not increase during treatment with tulathromycin as observed in those farms treated with ceftiofur, where a significant increase was observed. It is noteworthy that by the time of slaughter, we could not detect CR *E. coli* in any of the animals, nor from control either from the treated group.

No antibiotic selection pressure was needed to detect CR *E. coli* in five out of the eight farms, given that seven-day old piglets were excreting resistant bacteria before any treatment was administered. Based on these results, it appears that these bacteria were circulating in the farms prior to farrowing. The fact that most of the sows were positive for CR *E. coli* might explain the presence in their offspring due to vertical transfer during weaning (Liebana et al., 2012; Hansen et al., 2013; Callens et al., 2015). Additionally, sows originating from A gilts had a tendency to harbor CR *E. coli*, suggesting circulation of the same resistant organisms within these integrated production systems.

At the abattoir pigs carrying CR *E. coli* represent a public health concern (Ramos et al., 2013a). Faecal counts up to 10^4 cfu/mg of faeces were observed in some of the pigs in this study. Although a reduction in counts is expected during meat processing, some processes at the slaughterhouse may contribute to contamination of meat with resistant bacteria or to the cross-contamination of clean animals (Gomes-Neves et al., 2014). As a consequence, CR *E. coli* contaminated meat may reach the consumer. Infective doses for humans with *E. coli* may vary between 10^3 to 10^8 cfu. It is not clear what dosage of CR *E. coli* is required to transfer resistance genes to the human microbiota and/or to colonize the human gut (Smet et al., 2011). Any effort contributing to reduction of the load of antimicrobial resistant bacteria in primary production will have an impact in the final product, and therefore in protecting human health.

In this study pig production companies applied several families of prophylactic antimicrobials during the nursery period. Although such usage was not recommended by the authors of this research work, it allowed investigation of the emergence of CR *E. coli* in animals receiving registered doses of a combination of different antimicrobials (beta-lactams, aminoglycosides, tetracycline and pleuromutilins). Thus, it could be considered a “worst-case scenario” for the appearance of any AR that cannot be ignored when interpreting the results. Both groups in our study (control or treated) received the same antimicrobial selective pressure for at least 5 weeks. In spite of this long period of treatment, the proportion and counts of CR *E. coli* decreased from young piglets until the age of slaughter in all the farms. This result suggests that this treatment did not pose sufficient

selection pressure to increase CR *E. coli* populations. In any case, it must be highlighted that we were unable to detect any CR *E. coli* throughout the trial in pigs coming from three out of eight farms that were negative at the first sampling time. However, we only focused on measuring CR *E. coli* and other resistance phenotypes that this prophylactic treatment might have selected for were outside the scope of this study.

Finally, there are several limitations in this study. Due to the load of work, the number of farms included in the study was relatively low; however, there is sufficient power in the sample size to detect meaningful differences ($P < 0.05$) between the proportion of animals positive for CR *E. coli* and the counts of CR *E. coli* in animals treated with ceftiofur/tulathromycin and animals from the control group. Additionally, when performing experiments in real conventional farms, there are many factors that can also influence the results (e.g. sow origin, management, pig flow). Our experimental design does not have enough statistical potency to detect significant differences for the effect of all the potential factors on the emergence of CR *E. coli*. In summary, we have described factors influencing the appearance of CR *E. coli* in pigs from conventional farms after early treatment with antimicrobials but the influence of other factors, not described in this study cannot be excluded.

In conclusion, this study has demonstrated a great variability in the frequency of CR *E. coli* between farms independently of the treatment. Results revealed a short time period when the treatment with ceftiofur resulted in a transitory increase in the shedding of CR *E. coli*. More importantly, other risk factors such as the presence of CR *E. coli* in the sows and the age of the animals at study have an important role in the persistence of CR *E. coli*. CR *E. coli* positive

sows were more likely to have positive offspring, and CR *E. coli* positive piglets were likely to remain CR positive until slaughter. Strategies to control CR *E. coli* in the sows may prevent colonization of piglets by resistant bacteria at the beginning of the life cycle, which appears to be the critical point in time to reduce occurrence at slaughter.

” La meditación es el arte de romper hábitos para purificar la mente y para poder encargarte de los asuntos del día a día.” Y.B



ESTUDIO 3

ESTUDIO 3: Caracterización de *Salmonella* de granjas convencionales de cerdos.

STUDY 3: Characterization of *Salmonella* from conventional pig farms



Multidrug resistant *Salmonella* isolated from conventional pig farms that use antimicrobials as preventive medicine programmes.

Cameron-Veas K., et al., *manuscript in preparation*

Abstract

This longitudinal study assessed the effect in the emergence of cephalosporin resistant (CR) *Salmonella* of one treatment with ceftiofur or tulathromycin during the lactation period, and also investigated the presence of multidrug resistant *Salmonella* in fattening pigs reared under conventional preventive medicine programmes. Additionally, phenotypic and genotypic characterization of the *Salmonella* isolates was performed. In four conventional pig farms, a group of 7-day-old piglets were treated with an intramuscular injection of ceftiofur (n=40), whereas in another four farms with tulathromycin. A control group of animals (n=30) was left untreated in all farms. Animals were sampled prior treatment, 2 and 7 days post-treatment and at the time of slaughter. Minimal inhibitory concentration (MIC) to 14 antimicrobials, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and presence of different resistance genes were performed in all isolates. Plasmids carrying CR genes were characterised. Sixty-six *Salmonella* isolates were recovered from five of the eight farms. Of them, 49 were multiresistant and four contained *bla*_{CTX-M} genes harboured in conjugative plasmids of the IncI1 family. They were recovered before treatment with ceftiofur. *tet*(A) (77%), *sul1* (27%), and *tet*(B) (23%) genes were the most prevalent, and 10 isolates also presented *qnrB* genes. A direct relation could not be established between the use of ceftiofur and the occurrence of CR *Salmonella*. However, multidrug resistant was common, especially for ampicillin, streptomycin, sulphonamides and tetracycline. These antimicrobials are frequently used in veterinary medicine. To protect the consumer health, a more rational use of antimicrobials should be implemented in intensive pig farming.

Introduction

Salmonella is a major foodborne pathogen causing infections in humans and animals worldwide. A total of 89,873 confirmed human cases of salmonellosis were reported in the European Union (EU) during 2014 (EFSA-ECDC, 2016). In the EU, the reduction over the years in human salmonellosis cases, is mainly the result of the successful *Salmonella* control programmes established in poultry populations (EFSA-ECDC, 2014b). However, besides laying hens, asymptotically *Salmonella* infected pigs are the second major source of human salmonellosis (Pires, 2011). The prevalence of *Salmonella* from bacteriological monitoring of pigs in Europe ranges from 36.4% to 0%, depending of the country. Spain, the first producer of pigs for human consumption in the EU, reported a prevalence of *Salmonella* infection at slaughter of 29.4% in 2012 (EFSA-ECDC, 2014b).

Swine preventive veterinary medicine programmes are developed to control bacterial diseases. Thus, pig vaccination is not recommended against *Salmonella* serotypes that are transmissible to humans but non-pathogenic to pigs (San Ramon, 2013). Salmonellosis control programmes are mainly based on hygiene and disinfection, biosecurity measures, farm management practices, and antimicrobial use. Antimicrobials are considered essential tools to control clinical outbreaks involving bacteria as primary or secondary pathogens. However, they are also used as a metaphylactic and even prophylactic tool when the probability to have an outbreak of an unknown bacterial aetiology is very high (Barton, 2014). In any case, the selective pressure exerted by these compounds could contribute to the emergence of antimicrobial resistant (AR) and multidrug resistant bacteria (Garcia et al., 2014). Emergence of AR bacteria (and particularly *Salmonella*) associated to

pigs, affects animals but have implications in public health, since there is a risk of foodborne transmission to the consumer from farm to fork.

Third and fourth generation cephalosporins, such as ceftiofur and cefquinome, are licensed for the treatment of systemic bacterial infections in pig production. These beta-lactam antimicrobials are some of the most important compounds in human medicine, as they constitute the main therapeutic choice to treat infections caused by Enterobacteriaceae (Collignon et al., 2009). The possible selection of cephalosporin resistant (CR) *Salmonella* together with the worrisome of them entering the food chain has raised the debate on the use of these antimicrobials for animal husbandry. Furthermore, isolation of high proportion of multi-drug resistant *Salmonella* strains has been recently reported (Vico et al., 2011) with trending up considerably in recent years (Vico et al., 2011; EFSA et al., 2016).

This longitudinal study intended to evaluate the presence of multidrug resistant *Salmonella* in conventional fattening pig farms that use antimicrobials in their preventive veterinary programmes. Since beta-lactam antimicrobials (penicillins and cephalosporins) and macrolides (tulathromycin and tildipirosin) are the most commonly prescribed drugs during the suckling period in Spain, this study aimed to assess the effect of ceftiofur and tulathromycin treatments during the lactation period in the *Salmonella* population of pigs from day 7 after birth, up to departure to the abattoir. Likewise, the genotypic and phenotypic diversity of the *Salmonella* serovars obtained from each of the farms were analysed, and the presence of genes codifying for critical important antibiotics, such as cephalosporins and fluoroquinolones, was assessed.

Materials and methods

Study design

A longitudinal study was performed in 560 pigs from eight conventional farms located in Catalonia region (Cameron-Veas et al., 2016). None of these farms had a history of cephalosporin use, at least two years prior the study. The sampling period started in November 2012 and finished in May 2014. Briefly, 70 seven-day-old piglets per farm were ear tagged in both ears for identification throughout the study period. Farms were divided into two groups of four farms each, according to the experimental antimicrobial treatment administered, i.e. ceftiofur or tulathromycin. Within farm, one group of 7-day-old pigs (n=40) was treated with either ceftiofur (Naxcel®, Zoetis Spain S.L.U; 5 mg/kg of body weight) or tulathromycin (Draxxin®, Zoetis Spain S.L.U; 2.5 mg/kg of body weight), administered in a single intramuscular shot, as previously described (Cameron-Veas et al., 2016). The remaining pigs from each farm (n=30) were kept as internal untreated control. Then, during the rearing period, all pigs were fed under the standard nutritional program set by the companies in a prophylactic way (Table 1), from day 21 (at weaning) to day 49 (in the pre-starter and starter 1 feeds), as well as from day 50 to 70 (in the starter 2 feed). A total of 164 animals were not sampled at some point due to either death or loss of ear tags (Table 1).

Faecal samples were taken from seven-day-old piglets (D7) just before administration of the correspondent experimental treatment, at day 9 (D9), 14 (D14) of life, and just before the animals departed to the slaughterhouse (approximately 187 days of life). On D7, faecal samples were also collected from the mothers (n=7).

***Salmonella* culture and characterization**

Faecal samples were taken from the rectum (avoiding environment and cross contaminations) and transported to the laboratory at 4°C on the same day of sampling. At arrival, 5 gr / sample of faeces were individually homogenized in 25 mL of Buffer Peptone Water, and incubated at 37°C for 24h. After incubation, 0.1 mL was inoculated onto Rappaport-Vassiliadis Semisolid Medium and placed at 42°C for 24 and 48 h (if negative at 24 h), followed by streaking 1µL in XLT4 with and without ceftriaxone (1mg/L). One *Salmonella* isolate from each positive sample was selected for confirmation and serotyping at the reference laboratory in Spain (Algete Laboratory, Madrid, Spain), by the reference slide agglutination method for specific somatic, flagella and capsular antigens, using the Kauffmann-White scheme (Popoff et al., 2004).

Antimicrobial susceptibility testing

Minimal inhibitory concentration (MIC) to 14 different antimicrobials was analysed by the broth microdilution method (VetMIC GN-mo, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden) using ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, nalidixic acid, gentamicin, kanamycin, florfenicol, colistin and trimethoprim at the concentrations previously detailed (Sola-Gines et al., 2015). Epidemiological cut-off values were determined according to EUCAST recommendations (<http://www.eucast.org/>). Multidrug resistance was defined as resistance to antibiotics of at least three different families (Schwarz et al., 2010).

Two double disc combinations (cefotaxime with cefotaxime/clavulanic and ceftazidime with ceftazidime/clavulanic) were used for the confirmation of the extended spectrum betalactamase (ESBL) phenotype. Synergy was defined as increase in zone diameter ≥ 5 mm. Cefoxitin was used for the detection of *ampC*-type beta-lactamase (CLSI, 2008).

Antimicrobial-resistant genetic determinants

Resistance to cephalosporins was assessed by PCR for the following genes: *bla*_{TEM}, *bla*_{CTXM}, *bla*_{CMY-1}, *bla*_{CMY-2} and *bla*_{SHV}, as described previously (Hasman et al., 2005). Sequence analysis was performed using Vector NTI advance 11 (InforMax, Inc., Bethesda, MD). The amplified nucleotide sequences were compared to previously described sequences obtained from public databases (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Isolates exhibiting low susceptibility to ciprofloxacin were tested for the presence of plasmid mediated quinolone resistance genes (PMQR): *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* and *qnrS* genes (Wasył, 2014). Additionally, resistance to aminoglycosides (*aadA*, *strA/strB*, *aac(3)IV*, *aadB*, *aphA1* and *aphA2*), tetracycline (*tet(A)*, *tet(B)* and *tet(C)*) and sulfonamides (*sul1*, *sul2* and *sul3*) were also tested by PCR as previously described (Kozak et al., 2009).

Pulsed-field gel electrophoresis and plasmid characterization

To assess the clonality of the strains and the epidemiological relatedness within farms, *Xba*I- PFGE macro-restriction was conducted in a Chef-DR II System (Biorad) as described elsewhere (Ribot et al., 2006). PFGE profiles were compared using Fingerprinting II Informatix software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Isolates were considered to have a unique pattern when at least one band difference was detected. The analysis of the

bands generated was performed using the Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic averages (optimization of 1.5% and position tolerance 1.5%).

Plasmids from isolates showing ESBL phenotype were characterized by PCR-based replicon typing (PBRT) (Carattoli et al., 2005). Filter mating experiments together with plasmid DNA extraction and electroporation were performed as described elsewhere (Cameron-Veas et al., 2015). Transconjugants were selected on LB agar plates containing rifampicin (100 mg/L) and ceftriaxone (1mg/L). The presence of a unique plasmid in each transconjugant harbouring the cephalosporin resistant gene was confirmed, and their sizes were determined using S1-PFGE (Barton et al., 1995).

Statistical analysis

The prevalence and the proportion of isolated *Salmonella* strains resistant to different antibiotics were statistically compared by the χ^2 test with the Fisher's correction when required. Statistical analyses were carried out using the SAS System V.9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) and the significance level was set up at $P \leq 0.05$.

Results

***Salmonella* prevalence, serotypes and antimicrobial resistance**

Overall, a total of 2,117 faecal samples were collected during the course of the study. Of them, 66 were positive for *Salmonella* and were obtained from five out of the eight farms analysed. Most of the *Salmonella* strains were isolated at D7 (n=27) and D9 (n=16) from three farms, but also at the end of the experiment (n=18) from five farms.

The prevalence of *Salmonella* at D7 was higher ($p < 0.0001$) in Farm 2 (28.6%) than in the remaining farms (1%). Within this Farm 2, the weaned pigs kept as untreated control group prior taking medication showed a *Salmonella* prevalence (43%) higher ($p = 0.018$) than the prevalence of pigs kept as ceftiofur treated group (17.5%). However, a drastic reduction of prevalence was observed in the former group, showing similar proportion of shedders (13%) at D9 in both, untreated and treated groups. A significant reduction of *Salmonella* shedding was observed from D7 to D14, in both, the untreated and treated ($p < 0.05$) groups. At D14 and D187, only one infected sample was detected in each group of Farm 2 (Table 1). In Farm 5, *Salmonella* was found only in one pig treated with ceftiofur (3%) in contrasts to the 24% of positive pigs detected at D187 (Table 1). Furthermore, only two out of eight farms showed sows shedding *Salmonella*, being the offspring colonized by the same (Farm 2) or different (Farm 3) serotypes.

Among the 66 strains isolated, the most prevalent serotype was Rissen (58%) followed by the monophasic variant of Typhimurium (14%), as well as Panama and Brandenburg (11 %) (Table 1). The first two were the most

widely distributed serotypes, since were present in four and three of the positive farms, respectively.

Table 1. *Salmonella* strains isolated from feces at different intervals and treatments administered in each farm during the rearing cycle.

Farm code	Antimicrobials used at different post-birth intervals		Sampling at different post-birth intervals				
	Intramuscular (D7)	Pre-starter/Starter 1 (D21 to D49)	Starter 2 (D50 to D79)	D7	D9	D14	D187
				No. Strains/No Samples analyzed (%) - No. Serotypes			
1	Untreated	Amoxicillin, colistin sulphate	NA	2/30 (7%)	3 /30 (10%)	3/28 (11%)	2/28 (7%)
	Treated with tulatromycin			2 Rissen	3 Rissen	3 Rissen	2 Rissen
Sows			0/40	0/40	0/39	2/39 (5%)	2 Derby
	0/7						
3	Untreated	Amoxicillin, apramycin, tiamulin, oxytetracycline	Tiamulin, oxytetracycline	1/30 (3%)	3/30 (10%)	0/30	2/24 (8.3%)
	Treated with tulatromycin			1 Panama	3 Typhimurium monophasic	2 Panama	
Sows				2/40 (5%)	1/40 (2.5%)	0/40	3/36 (8.3%)
	1/7 (14.2%)						
6	Untreated	Amoxicillin, apramycin, tiamulin, oxytetracycline	Tiamulin, oxytetracycline	1 Typhimurium monophasic	0/30	0/30	0/24
	Treated with tulatromycin			0/30	0/30	2/34 (5.8%)	1 Rissen
Sows				0/40	0/40	0/40	1 Typhimurium monophasic
	0/7						
7	Untreated	Amoxicillin, apramycin, tiamulin, oxytetracycline	Tiamulin, oxytetracycline	0/30	0/30	0/30	0/16
	Treated with tulatromycin			0/40	0/40	0/40	0/30
Sows				0/7			

Table 1. *Salmonella* strains isolated from feces at different intervals and treatments administered in each farm during the rearing cycle. (Continuation)

Farm code	Antimicrobials used at different post-birth intervals		Sampling at different post-birth intervals					
	Intramuscular (D7)	Pre-starter/Starter 1 (D21 to D49)	Starter 2 (D50 to D79)	No. Strains/No Samples analysed (%) - No Serotypes				
2	Untreated			D7	D9	D14	D187	
	Treated with ceftiofur			13/30 (43%) 2 Brandenburg 11 Rissen*	4/30 (13%) 4 Rissen*	1/30 (3.3%) 1 Rissen	1 Typhimurium monophasic	1/22 (4.5%)
2	Treated with ceftiofur			7/40 (18%) 3 Anatum* 3 Rissen*	5/40 (13%) 3 Brandenburg 2 Rissen	1/38 1 Rissen	1 Typhimurium monophasic	1/38 (2.6%)
				Sows	1 Brandenburg			
4	Untreated	Amoxicillin, apramycin, tiamulin, oxytetracycline	Tiamulin, oxytetracycline	1/7 (14.2%) 1 Brandenburg				
	Treated with ceftiofur			0/30 0/40	0/30 0/40	0/30 0/40	0/18 0/35	
5	Untreated			0/30	0/30	0/26	4/17 (24%) 4 Rissen	
	Treated with ceftiofur			0/40	0/40	0/37	1/33 (3%) 1 Rissen	
8	Untreated			0/7	0/29	0/21	0/21	
	Treated with ceftiofur			0/37	0/36	0/34	0/0	
Sows				0/7				
Total strains 66				27/614 (4.4%)	16/555 (0.9%)	5/533 (0.9%)	18/415 (4.3%)	

* CR *Salmonella*: Anatum (1), Rissen (3), NA: Not applicable.

As shown in Figure 1, most of the 66 *Salmonella* isolates showed resistance to tetracycline (98%), ampicillin (58%), sulphamethoxazole (53%), streptomycin (58%), ciprofloxacin (50%), trimethoprim (32%), gentamicin (20%), chloramphenicol (20%), and nalidixic acid (15%). Eight isolates were resistant to florfenicol and three to kanamycin. None of the strains exhibited resistance to colistin. Moreover, 47 strains were resistant to at least 3 out of the 14 antimicrobials tested, exhibiting 19 different antimicrobial resistance profiles. Among them, 57% of the *Salmonella* isolated were resistant to at least four antimicrobials, being most of them (31/38) resistant simultaneously to ampicillin (A), streptomycin (S), sulfonamides (Su) and tetracycline (T) alone or combined with another antimicrobials, thus owning the ASSuT antimicrobial profile (Table 2). Furthermore, 89% (16/18) of the *Salmonella* isolates recovered just before the animals departed to the abattoir were multiresistant. The statistical analysis did not show significant differences in the frequency of antimicrobial resistance between serotypes, probably due to the low number of strains found in some serotypes. Only one isolate (serotype Rissen) was pansusceptible (Figure 1) and three strains (two *S. Rissen* and one *S. Anatum* from Farm 2) showed resistance to cephalosporins (Table 2).

According to the antimicrobial phenotypes, *tet(A)* (77%), *sul1* (27%), and *tet(B)* (23%) genes were the most prevalent detected in this *Salmonella* collection (Table 2). Moreover, *qnrB* genes were detected in 10 (15%) isolates, involving four different serotypes, i.e. Brandenburg (n=5), Anatum and Rissen (n=2 each), and Panama (n=1) (Table 2). Nine of these strains were collected from the same farm (Farm 2) and *S. Panama* from Farm 3 (Figure 1).

Resistance to cephalosporin was associated to *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-14} genes in two different *S. Rissen* strains and to *bla*_{CTX-M-1} in one *S. Anatum* isolated from three seven-day old piglets in Farm 2, i.e. prior to ceftiofur administration. An additional *S. Rissen bla*_{CTX-M-1} strain was found from the same animal in the second visit (at D9) after ceftiofur treatment (Table 1). CR *Salmonella* was not detected in further visits to this farm. All *Salmonella* strains harbouring CTX-M transferred the genes to the recipient strain. In all cases, CTX-M genes were harboured in a 95 Kb plasmid belonging to the IncI1 incompatibility group.

Table 2. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles of the *Salmonella* strains obtained in this study, grouped by serotypes.

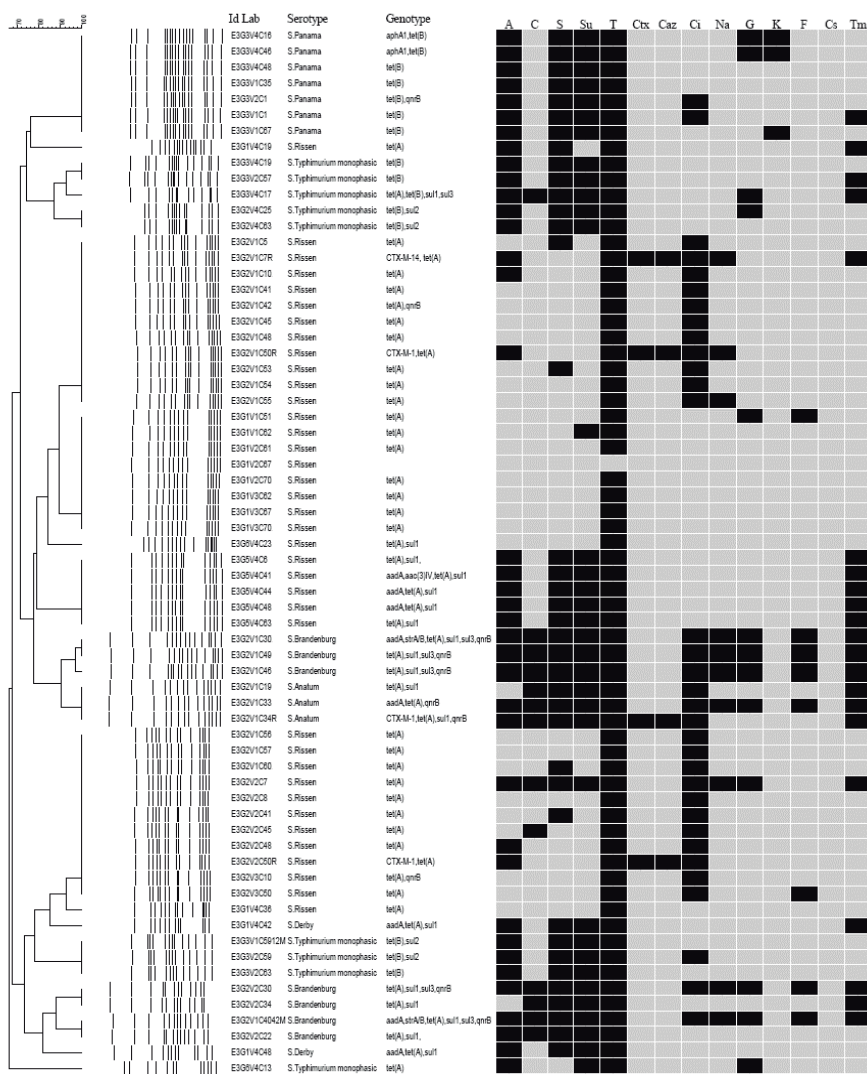
Serotype	Phenotype ^a (No. strains)	Genotype ^b (No. strains)
Rissen (38)	ACSSuTCiNaGTm (1)	<i>tet</i> (A) (1)
	ASSuTTm (5)	<i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1 (2); <i>aadA</i> / <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1 (2); <i>aadA</i> / <i>aac</i> (3)IV/ <i>tetA</i> / <i>sul</i> 1 (1)
	ASTTm (1)	<i>tet</i> (A) (1)
	ATCtxCazCiNa (1)	<i>tet</i> (A)/ <i>bla</i> _{CTX-M} (1)
	ATCtxCazCi (1)	<i>tet</i> (A)/ <i>bla</i> _{CTX-M} (1)
	ATCi (2)	<i>tet</i> (A) (2)
	ATCtxCazCiNaTm (1)	<i>tet</i> (A)/ <i>bla</i> _{CTX-M} (1)
	TCiNa (1)	<i>tet</i> (A) (1)
	STCi (4)	<i>tet</i> (A) (4)
	TCi (9)	<i>tet</i> (A)/ <i>qnrB</i> (2); <i>tet</i> (A) (7)
	TCCi (1)	<i>tet</i> (A) (1)
	TCiF (1)	<i>tet</i> (A) (1)
	TGF (1)	<i>tet</i> (A) (1)
	T (7)	<i>tet</i> (A) (6); <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1(1)
	SuT (1)	<i>tet</i> (A) (1)
Pansusceptible (1)	Not found	
Typhimurium monophasic (9)	ASSuTCi (1)	<i>tet</i> (B)/ <i>sul</i> 2 (1)
	ASSuTG (1)	<i>tet</i> (B)/ <i>sul</i> 2 (1)
	ACSSuTGTm (1)	<i>tet</i> (B)/ <i>sul</i> 1/ <i>sul</i> 2I (1)
	ASuTG (1)	<i>tet</i> (A) (1)
	ASSuTTm (1)	<i>tet</i> (B) (1)
	ASSuT (4)	<i>tet</i> (B)/ <i>sul</i> 2 (2); <i>tet</i> (B)(2)
Brandenburg (7)	ACSSuTCiNaGFTm (5)	<i>aadA</i> / <i>strA</i> /B/ <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1/ <i>qnrB</i> (1); <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1/ <i>sul</i> 3/ <i>qnrB</i> (3); <i>aadA</i> / <i>strA</i> /B/ <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1/ <i>sul</i> 2/ <i>qnrB</i> (1)
	ACSSuT (1)	<i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1 (1)
	CSSuTTm (1)	<i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1 (1)
Panama (7)	ASSuTCi (1)	<i>tet</i> (B) (1)
	ASSuTCiTm (1)	<i>tet</i> (B)/ <i>qnrB</i> (1)
	ASSuTGK (2)	<i>aphA</i> 1/ <i>tet</i> (B) (2)
	ASSuT (2)	<i>tet</i> (B) (2)
	ASSuTK (1)	<i>tet</i> (B) (1)
Anatum (3)	CSSuTCiTm (1)	<i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1 (1)
	ACSSuTCiNaGFTm (1)	<i>aadA</i> / <i>strA</i> /B/ <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1/ <i>qnrB</i> (1)
Derby (2)	ACSSuTCTxCazCiTm (1)	<i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1/ <i>qnrB</i> / <i>bla</i> _{CTX-M} (1)
	ASSuTTm (1)	<i>aadA</i> / <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1 (1)
	ASSuT (1)	<i>aadA</i> / <i>tet</i> (A)/ <i>sul</i> 1 (1)

^a See Figure 1 for antimicrobial nomenclature; Ctx: Cefotaxime and Ceftazidime; Aminoglycosides: *aadA*, *strA*/*strB*, *aac*(3)IV, *aadB*, *aphA*1, *aphA*2; Tetracycline: *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C); Sulfonamides: *sul*1, *sul*2, *sul*3; Quinolones: *qnrA*, *qnrB*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*; Beta-lactams: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, *bla*_{SHV}.

Genotyping

Macro-restriction analyses by *Xba*I produced on average 12 to 16 bands and distributed the 66 isolates into eight major clusters consisting of isolates with related PFGE profiles (80% identity), and three unique PFGE patterns represented by a single isolate each (Figure 1). PFGE analysis demonstrated a very low clonality between *Salmonella* strains of the same serovar within farms. Indistinguishable fingerprints were present in isolates from different animals, and from isolates obtained at different sampling times, indicating the persistence of clones over time. Two of the *Salmonella* Rissen resistant to cephalosporin collected from the Farm 2 presented identical PFGE patterns (strains Id Lab codes E3G2V1C7R and E3G2V1C50R, in Figure 1).

Figure 1. Dendrogram illustrating *Xba*I-PFGE profiles and antimicrobial resistance phenotype of *Salmonella* (n=66) isolated in faeces of fattening pigs of Catalonia (Spain).



A: Ampicillin (Wild Type -WT- ≤8mg/L); C: Chloramphenicol (WT≤16mg/L); S: Streptomycin (WT≤16mg/L); Su: Sulfamethoxazole (WT≤64mg/L); T: Tetracycline (WT≤8mg/L); Ctx: Cefotaxime (WT≤0.25mg/L); Caz: Ceftazidime (WT≤0.5mg/L); Ci: Ciprofloxacin (WT≤0.064mg/L); Na: Nalidixic acid (WT≤16mg/L); G: Gentamicin (WT≤2mg/L); K: Kanamycin (WT≤8mg/L); F: Florfenicol (WT≤16mg/L); Cs: Colistin (WT≤2mg/L);Tm: Trimethoprim (WT≤2mg/L)

Discussion

This longitudinal study intends to evaluate if preventive veterinary medicine programmes used in conventional fattening pig farms may have a direct effect in the emergence of CR *Salmonella*, especially when a one shot treatment with ceftiofur is applied during the lactation period. Although the animals were treated with ceftiofur at early stage followed by a long period of treatment with amoxicillin, the occurrence of CR *Salmonella* decreased and disappeared during the course of the study. Several biologically plausible reasons may explain this result. CR *Salmonella* might have been outcompeted by the susceptible flora, if the maintenance of the plasmid represented a fitness cost (Villa et al., 2010). In vitro experiments have demonstrated the ability of some pathogens to overcome the deleterious effect of the fitness cost by compensatory evolution (Andersson et al., 1999). However, balancing the cost of antimicrobial resistance could be a limiting process (Lipsitch, 2001), especially in a complex environment such as the farm, where other environmental factors may play an important role driving selection of resistant bacteria, for instance bacterial interaction, synergistic or antagonistic effect that the different compounds (such as coccidiostats, hormones) may have in the bacterial population. On the other hand, the techniques use for isolation of *Salmonella* in the laboratory might not allow the detection of CR *Salmonella* if they are at very low numbers.

Antimicrobial resistance was common among *Salmonella* serovars, and the majority of these serovars have been associated with human infections (EFSA et al., 2011). Furthermore, 16 out of 18 isolates recovered in the last visit to the farm and before the animals departed to the abattoir were multiresistant. Multidrug resistant *Salmonella* might pose a risk to the consumer if these strains enter the food chain. Although gastroenteritis

infections caused by non-typhoidal *Salmonella* are mostly self-limiting and treatment is not required, ~5% of the individuals will develop bacteraemia, a potential fatal problem that requires antibiotic treatment (Anjum et al., 2011). In these cases, the recommended drugs of choice are fluoroquinolones and cephalosporins. Since the treatment of many infectious human and livestock diseases now relies on just one or two drugs (Woolhouse et al., 2014), strict policies of antibiotic use should be implemented in farm animals in the EU, in order to preserve the use of those antimicrobials of critical importance to human health.

In the four isolates resistant to cephalosporins isolated from Farm 2, CTX-M genes were harboured in a conjugative plasmid of 95kb. In agreement with other studies (Rodriguez et al., 2009; Zurfluh et al., 2014), they were associated to *Incl1* incompatibility group. Interestingly, Farm 2 also presented high prevalence of CR *Escherichia coli* all over the study period (Cameron-Veas et al., 2016) associated to the same type of plasmids (data not shown), indicating a possible exchange of mobile genetic elements between the different Enterobacteriaceae species.

The quinolone-resistance *qnrB* gene was detected in different *Salmonella* serotypes coexisting in the same farm, thus, suggesting possible genetic transfer between bacteria. Resistance to tetracycline was very common and correlated with the presence of *tet(A)* and *tet(B)* genes. Additionally, resistance to aminoglycosides encoded by *aphA1*, *aadA*, and *aac(3)IV* was also present. In fact, as illustrated in Table 1, all of the conventional farms included in this study administered, at least, four families of antimicrobials (β -lactams, polymyxins, aminoglycosides and tetracyclines) during the rearing cycle. The antimicrobials described in this study are some of the most

extensively used in pig production in Spain (Moreno, 2014c, b; EMA, 2015). Thus, farms included in this study are representatives of an “average” intensive pig farm in relation with the antimicrobial use. In this study, multidrug resistant *Salmonella* phenotypes exhibited high level of resistance to streptomycin, ampicillin and sulphonamides. It is tempting to think that the selective pressure exerted by the use of these antimicrobial families are the cause of the multidrug resistant profiles observed. Unfortunately, our study design does not allow linking the use of antimicrobials with the presence of these multidrug resistant profiles. It would be desirable to carry out additional studies including farms where the use of antimicrobials is scarce to tackle this matter. In any case, it seems reasonable to reduce not only the total antimicrobial consumption, but also the number of antimicrobial families to avoid as much as possible, the emergence of antimicrobial resistance by cross-resistance. On the other hand, novel pen-side diagnostic tests for fast confirmation of common bacterial diseases should be developed to avoid misuse of the therapeutic armamentarium. Additionally, several countries have reported that the overall antimicrobial use in pig herds varied largely depending on herd (Sjolund et al., 2015; van Rennings et al., 2015). This situation would probably be amended if harmonised treatment guidelines for the major bacterial diseases affecting swine production were in place. Treatment guidelines would probably reduce the emergence of multidrug resistant *Salmonella* strains, and would definitely preserve the efficacy of the antimicrobials.

Results from the PFGE have demonstrated a very low clonality between the same serovars at each farm. However, transmission of *Salmonella* from mothers to piglets has been observed, for which targeted intervention strategies should be developed to avoid vertical transmission of *Salmonella*.

The most common serovars obtained in this study were Rissen followed by Typhimurium monophasic (4,[5],12:i:-). In Europe, the prevalence of *S. Typhimurium* monophasic (4,[5],12:i:-) causing foodborne outbreaks and present in pigs and pork products have been increasing (Hopkins et al., 2010; EFSA et al., 2011). Additionally, the two major clones circulating in Europe show multidrug resistance to four different antimicrobial families, i.e. ampicillin, streptomycin, sulphonamide and tetracycline (ASSuT family profile) (Garcia-Migura et al., 2014). In this study, the nine *S. Typhimurium* monophasic strains showed the described phenotype (Table 2), and five of them (i.e. E3G3V4C17, E3G3V4C19, E3G2V4C25, E3G2V4C63 and E3G6V4C13, in Figure 1) were recovered just before the animals departed to the abattoir. Pigs may be a potential reservoir of this serovar and continuous surveillance should be implemented to understand the molecular mechanisms and the environmental forces driving the emergence and spread of these clonal lines.

In conclusion, one shot treatment with ceftiofur in piglets did not increase the presence of CR *Salmonella* in any of the studied farms. However, multidrug resistant *Salmonella* were present in those farms where antimicrobials are used as preventive veterinary programmes for the treatment of infectious diseases. Resistance to critical important antimicrobials were detected in transferrable plasmids implicating a potential risk to human health if transfer via food chain. In depth studies are necessary to identify on-farm treatments with minimal impact on the emergence of resistant organisms.

” El arte de ser inteligente es ser pequeño, que puede contenerlo todo. El arte del éxito es responder al llamado del deber con gracia y compasión. El arte de la felicidad es servir a todos y todos te servirán a ti.” Y.B.



DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Recientemente, España se ha convertido en el tercer productor mundial de porcino, después de China y EEUU, superando Alemania (MAGRAMA., 2015). La industria de la producción de cerdos en España se ha transformado en el primer sector de la ganadería, con una producción anual estimada, próxima a los 6.000 millones de euros (MAGRAMA., 2015). Esta situación ha hecho que la producción se intensifique y que los programas de medicina preventiva se basen, en ocasiones en un sobreuso de los antibióticos. Así, el uso de antibióticos a nivel profiláctico y/o metafiláctico, es una práctica muy habitual durante la etapa de lactación, transición, engorde y periparto (Callens et al., 2012; Fraile, 2014). La administración de antimicrobianos vía parenteral junto a prácticas de manejo como la administración de hierro, es recurrente en las explotaciones durante la fase de lactación (Callens et al., 2012). En nuestros dos estudios, tanto el longitudinal (Estudio 1) como el llevado a cabo en las ocho granjas (Estudios 2 y 3), se utilizó un tratamiento puntual con ceftiofur (cefalosporina de tercera generación) en lechones de siete días, observándose un aumento transitorio de la población de *E. coli* resistente a cefalosporinas (RC) durante el curso del tratamiento. En el caso de *Salmonella*, no se observó dicho incremento. Para ambas especies bacterianas, el tratamiento con ceftiofur no fue un factor de riesgo en la persistencia de la población RC, y en ausencia de la presión selectiva estas resistencias desaparecieron. Estos resultados concuerdan con estudios parecidos llevados a cabo en otras especies animales también destinadas a consumo humano. (Jiang et al., 2006; Singer et al., 2008)

Hay que tener en cuenta, que cuando se aplica un tratamiento con antibiótico de corta duración, como ceftiofur, hay una eliminación de cepas comensales sensibles de *E. coli* y una predominancia de cepas resistentes, cosa que se puede observar en los recuentos de población bacteriana llevados a cabo en el Estudio 2. Generalmente, no se trata de un fenómeno permanente. Las bacterias persistirán, si el antibiótico continúa siendo administrado. Si no, lo más probable es que las bacterias susceptibles vuelvan a predominar, como parece que ocurre en nuestro Estudio 1, donde los resultados nos sugieren que tal vez la población resistente no pudo competir con la población susceptible después de finalizado el tratamiento (Singer et al., 2008). Cuando, por el contrario, el uso del antibiótico es por tiempos prolongados, los microorganismos resistentes pueden persistir, incluso sin el antibiótico que los seleccione (FAO, 2004). En general, la adquisición de un mecanismo de resistencia supone a la bacteria “un coste biológico”, que se traduce en una reducción en la velocidad de crecimiento. Cuando la bacteria resistente está en presencia del antibiótico, tiene ventaja sobre la bacteria sensible porque aunque crezca más despacio, al menos puede sobrevivir. En teoría, si el antibiótico desaparece, las bacterias sensibles irían poco a poco reemplazando a las bacterias resistentes por poseer una mayor velocidad de crecimiento. Sin embargo, en muchas ocasiones no ocurre esta sustitución debido a la producción, al azar, de “mutaciones compensatorias” que permiten remediar el “coste biológico”, incrementando la velocidad de crecimiento de las bacterias resistentes. En este caso, en ausencia de antibiótico, la bacteria resistente no estaría desfavorecida respecto a la bacteria sensible (Torres, 2012).

Si bien, el uso de ceftiofur está exclusivamente restringido (Hornish et al., 2002) al tratamiento de metritis aguda post-parto en bovino y tratamiento de enfermedades bacterianas respiratorias, septicemia y poliartritis en cerdos (EMA, 2009), pertenece a una familia de antimicrobianos definidos por la OMS como de uso crítico para la salud humana (Collignon et al., 2009). Aunque es preferible preservar este tipo de antimicrobianos para medicina humana, y no recomendamos su prescripción, en aquellos casos en los que se haga un buen diagnóstico de la enfermedad, basado en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, nuestros resultados avalan que un uso puntual con ceftiofur de manera terapéutica en lechones de 7 días, no aumenta el riesgo de que los animales finalicen su ciclo productivo colonizados por *E. coli* o *Salmonella* RC. Sin embargo, durante el curso del tratamiento, los animales excretaron *E. coli* RC, por tanto quizá habría que considerar la implementación de medidas de bioseguridad extras durante este período de tiempo, como podría ser la eliminación de heces con mayor frecuencia, o el aislamiento de los animales tratados, como forma de evitar o controlar de cierto modo la transmisión de genes de resistencias entre animales. La diversidad de los clones revelada por los resultados de campo pulsado durante el Estudio 1, sugirió que algunos de estos clones fueron intercambiados entre los lechones de un mismo corral. Por otra parte, los granjeros podrían ser un potencial factor de riesgo de contaminación y transmisión cuando estos animales están excretando *E. coli* RC, por lo que el cambio de calzas entre corrales de animales tratados, podría disminuir este riesgo de diseminación.

Hablando de factores de riesgo que pueden influir en la transmisión de resistencias, en el Estudio 2 observamos que aquellas explotaciones donde las cerdas estuvieron alojadas en corrales abiertos, mostraron una tendencia estadística a presentar un mayor porcentaje de animales positivos a *E. coli* RC, que las alojadas en corrales individuales. Si bien la nueva legislación sobre bienestar animal puesta en marcha en el 2013 (BOE, 2013b), obliga a mantener a las cerdas en corrales abiertos, nuestros resultados sugieren que este tipo de instalaciones pueden ayudar a la propagación de bacterias resistentes en las cerdas, y por ende a su futura descendencia. Sin embargo, es necesaria la realización de nuevos estudios enfocados a confirmar esta hipótesis y así obtener más información para establecer estrategias de intervención en las cerdas, en aquellos casos en que estas resultaran positivas a microorganismos resistentes.

Es interesante destacar que tanto en el Estudio 1 como en el Estudio 2, encontramos la presencia de bacterias resistentes durante los primeros días post-nacimiento y antes que estos lechones fueran tratados. Sin embargo en el Estudio 1 (a diferencia del Estudio 2), no se aislaron *E. coli* RC en las madres, y la granja estuvo despoblada seis meses previos a nuestro estudio. A esta granja se le aplicó un protocolo de limpieza y desinfección antes de que las madres entraran en ella. Con los datos que tenemos es complicado elucidar la procedencia de dichas cepas resistentes, ya que no tuvimos la posibilidad de hacer un muestreo ambiental antes de comenzar el estudio, cosa que habría ayudado a esclarecer si cepas de *E. coli* RC estaban presentes en la granja a pesar de la desinfección llevada a cabo. Sin embargo, se realizó este análisis un año después del término del estudio y encontramos *E. coli* RC con

genes *bla*_{CTXM} (datos no mostrados). Estos resultados nos llevan a pensar que existe una persistencia de *E. coli* RC en el medio ambiente. También existe la posibilidad de que algunos desinfectantes o antisépticos, seleccionen para ciertos mecanismos de resistencia a antibióticos. De hecho, algunos de los mecanismos de resistencia desarrollados por bacterias, como bombas de flujo que bombean productos tóxicos para la bacteria desde el interior de la célula hacia el exterior, pueden ser comunes tanto para desinfectantes como para antibióticos (Bager et al., 1997; Gilbert et al., 2003; Gaze et al., 2005). Incluso algunos metales, como el zinc y cobre que se suelen usar como aditivos de piensos, pueden seleccionar bacterias resistentes por su capacidad de bombeo hacia el exterior de diversos agentes (FAO, 2004). También, algunos vectores pueden haber introducido bacterias resistentes dentro de la nave como moscas, roedores y/o artrópodos, que siempre están presentes en las granjas. Estos vectores están en contacto directo con las heces de animales, basura, comida, seres humanos, pudiendo ser un reservorio de bacterias resistentes, contribuyendo a la propagación de genes de resistencia entre los diferentes nichos ecológicos (Liu et al., 2013; Solá-Gines et al., 2015). Por otra parte, también existe la posibilidad de que el personal de granja haya introducido bacterias resistentes que durante el manejo pudieran llegar a colonizar a los animales. Existen estudios que han demostrado la presencia de genes BLEE y plásmidos de muestras de granjeros con similares perfiles genéticos de *E. coli* que los encontrados en animales de su granja (Dierikx et al, 2013).

Sin embargo, en el caso del Estudio 2, en todas aquellas granjas en las que se aislaron cepas de *E. coli* RC en las madres, se observó una mayor probabilidad

de que los lechones fueran positivos antes de administrarles el tratamiento. El hecho de que la mayoría de las madres fueran positivas a *E. coli* RC podría explicar la presencia en su descendencia a través de transmisión vertical durante la lactancia y su persistencia en el destete (Liebana et al., 2012; Hansen et al., 2013; Callens et al., 2015). Considerando estos antecedentes, uno de los puntos críticos para la transmisión y persistencia de microorganismos resistentes, sería la prevención de la colonización de los lechones reduciendo la presencia en sus madres. Además, hay que destacar que en este segundo estudio, siete de las 8 granjas provenían de una misma integradora, y tres de estas granjas compartían un mismo origen genético (abuelas A), es decir, las madres procedían de las mismas reproductoras (abuelas) A y en las otras cuatro granjas provenían de un origen B. En este estudio observamos una tendencia estadística a que los lechones que compartían origen A excretaran *E. coli* RC. Esto nos llevó a investigar la granja de las reproductoras. Es interesante apuntar que dichas reproductoras habían sido tratadas con ceftiofur 12 meses antes del estudio. Por otra parte, en el manejo de las reproductoras no se lleva una política de “todo dentro, todo fuera” ya que se realiza la reposición anual del 50% de los animales, cosa que dificulta la limpieza y desinfección a fondo de la granja. Esta práctica de gestión de la explotación, podría desempeñar un papel importante en la persistencia de bacterias resistentes en las granjas (Laube et al., 2013; Hering et al., 2014; Laube et al., 2014) y permitir la recirculación de bacterias resistentes en sistemas integrados de producción.

En el Estudio 2, en cuatro de las ocho granjas, los animales fueron tratados con tulatromicina. Elegimos este antimicrobiano de la familia de los

macrólidos porque es de última generación, de importancia crítica para la salud humana (Collignon et al., 2009) y además, es utilizado frecuentemente por ser de dosis única y por su efectividad para el tratamiento de enfermedades respiratorias (Nowakowski et al., 2004) en vacuno y porcino. Es interesante mencionar que en dos de las tres granjas que fueron positivas para *E. coli* RC al final del ciclo productivo, recibieron tratamiento con tulatromicina. Sin embargo, la selección de cepas resistentes probablemente fue más debida al uso de antibióticos en el programa de medicina preventiva que al uso de tulatromicina, puesto que las enterobacterias son en su mayoría resistentes a los macrolidos de forma natural.

Se ha reportado que uno de los principales mecanismos de resistencia de bacterias Gram negativas frente a la familia de los betalactámicos, es la producción de enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico, conocidas como betalactamasas (Seral Garcia et al., 2010). Las BLEE son consideradas como una importante amenaza para la salud pública. Los genes que las codifican pueden encontrarse en el cromosoma o en elementos genéticos móviles como plásmidos. Estos últimos facilitan su diseminación y con frecuencia confieren co-resistencia a otros antimicrobianos como se observó en el Estudio 1. Como demostraron los experimentos de transformación y conjugación, gracias a la presencia de genes de resistencia a cefalosporina albergados en plásmidos, se dio una selección de microorganismos resistentes a un amplio rango de diferentes familias de antimicrobianos, como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfametoxazol y trimetoprim.

En el caso de *Salmonella* RC encontradas en la Granja 2 del Estudio 2, también se encontraron los genes BLEE más comunes, CTX-M-1 y CTX-M-14 (Riano et al., 2006; Carattoli, 2008). Estos mismos genes se detectaron en aislados de *E. coli* RC pertenecientes a la misma granja (estudio que no forma parte de esta tesis), sugiriendo una transferencia genética entre diferentes especies bacterianas (Brinas et al., 2005; Blanc et al., 2006; Liebana et al., 2006; Meunier et al., 2006; Carattoli, 2008). Está descrito que a diferencia de otras enterobacterias, *Salmonella* carece de betalactamasas cromosómicas constitutivas. Esto es debido al coste biológico que supone su mantenimiento, ya que la expresión de este tipo de enzimas resulta incompatible con la capacidad invasiva y de multiplicación intracelular de *Salmonella* (Seral Garcia et al., 2010). Así pues, lo más habitual es que, si *Salmonella* llega a producir betalactamasas, estas sean de origen plasmídico, siendo los genes más frecuentes TEM, CTX-M, SHV y OXA (Seral Garcia et al., 2010).

Tanto en las cepas de *E. coli* RC, como los cuatro aislados de *Salmonella* RC, los genes de RC pudimos detectarlos asociados a plásmidos conjugativos de distintos tamaños y de grupos de incompatibilidad plasmídica comúnmente descritos en enterobacterias como *IncI1*, *IncN*, *IncFIA*, *IncFIB*, *IncA/C*, *IncHI1* e *IncHI2*. Algunos de estos replicones han sido asociados a genes de resistencia e incluso a genes de virulencia (Rayamajhi et al., 2011). Diferentes estudios han detectado aislados de *Salmonella* de origen animal y humano (Cloeckaert et al., 2010) con genes CTX-M-1 asociados a plásmidos conjugativos pertenecientes al grupo de incompatibilidad *IncI1* como hemos encontrado nosotros. De hecho es uno de los grupos de incompatibilidad

plasmídica de mayor incidencia identificados (Carattoli, 2009). Para aislados de *E. coli* RC en cerdos se han encontrado plásmidos transferibles con replicones del grupo de incompatibilidad plasmídica *Inc11*, *IncFIA*, *IncFIB*, *IncN* con genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} (Wang et al., 2016). Similares resultados pudimos observar en el Estudio 1, donde por ejemplo detectamos *bla*_{CTX-M-15} (Wang et al., 2016) en plásmidos conjugativos de alto peso molecular (150 pb). CTX-M-15 es una de las variantes más frecuentemente encontrada en humanos, comprometiendo los tratamientos debido a su capacidad para hidrolizar la cefotaxima y ceftazidima (Canton et al., 2006; Livermore et al., 2007), y encontrándose excepcionalmente en veterinaria (Carattoli, 2008).

Por otro lado, en los aislados de *E. coli* RC del Estudio 1 y de *Salmonella* del Estudio 3, se encontraron una alta proporción de fenotipos de multirresistencia, mostrando alto nivel de resistencia conjuntamente a tetraciclinas, ampicilina, estreptomina y sulfonamidas. En este caso, es tentador pensar que la presión selectiva ejercida por el uso continuado de estas familias de antimicrobianos que forman parte de los programas de medicina preventiva más utilizados en las granjas Españolas durante los últimos años (EMA, 2015.), podrían ser la causa de estos perfiles de multirresistencia observados en ambas especies bacterianas. Dentro de las actividades que se realizan en los programas de medicina preventiva incluyen medicación de grupo de animales por vía oral en el alimento o agua con una combinación de diferentes antimicrobianos (estreptomina, amoxicilina, sulfonamidas y tetraciclinas), durante un par de semanas, para prevenir problemas entéricos, respiratorios, nerviosos o septicémicos.

También, en ambas especies bacterianas, hemos detectado la presencia de cepas con baja susceptibilidad a fluoroquinolonas. En el caso de *Salmonella*, encontramos 10 cepas que contenían los genes *qnrB*, asociados a plásmidos (plasmid mediated quinolone resistance-PMQR). Los genes *qnr* son responsables de la resistencia a fluoroquinolonas y se encuentran dentro de plásmidos transferibles por conjugación, lo que mejora su capacidad de propagación de manera más eficiente (Stokes et al., 2011), con un amplio rango de hospedadores en especies bacterianas como *E. coli*, *Salmonella*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, o *Pseudomonas aeruginosa* (Martinez-Martinez et al., 1998). La resistencia a quinolonas se suele dar de manera natural por mutaciones cromosómicas que afectan a las regiones de la DNA girasa (*gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) (Sanders, 2001). Se producen por errores de transcripción durante la replicación cromosómica y ocurren en rangos de entre 10^6 y 10^9 . Sin embargo, la presencia de genes *qnr* puede aumentar el número de mutaciones que causan resistencia a quinolonas y además pueden estar mediadas por plásmidos asociados a otros genes de resistencia como las cefalosporinas (Looft et al., 2012b). En los últimos años en Europa se ha descrito un aumento de las resistencias a quinolonas debida a PMQR (Cattoir et al., 2009)

En los tres estudios que recopilamos en esta tesis, hemos detectado cepas multirresistentes tanto de *E. coli* como de *Salmonella* antes de que los animales partieran a matadero. Estos resultados indican que los cerdos destinados al consumo humano son un potencial reservorio de cepas multirresistentes. Esto puede suponer un riesgo para el consumidor si estas cepas entran en la cadena alimentaria. En general, la cadena de despiece en

matadero está diseñada de tal manera que reduzca la probabilidad de la entrada de microorganismos zoonóticos de la granja a la mesa. Sin embargo puede haber puntos críticos en los que se dé la contaminación por rotura de una canal o contaminaciones cruzadas que permitan la proliferación de bacterias multirresistentes, si estas están presentes. Es por esto que todas las medidas preventivas que se puedan tomar en la granja que minimicen la presencia de bacterias multirresistentes, tendrán un efecto positivo en el producto final, y por tanto indirectamente en la salud pública.

Hoy en día está claro que la selección y diseminación de resistencias antimicrobianas es multifactorial, y que afecta a diversos sectores como la salud humana, salud animal, agricultura, medioambiente y comercio. El uso inapropiado e indiscriminado de los antimicrobianos es uno de los factores principales que contribuyen a este fenómeno, junto al control deficiente de las infecciones bacterianas. Es por ello que cuando se detecta una infección que requiere el uso de antimicrobianos en determinadas explotaciones, debe llevarse a cabo un análisis en profundidad del problema y se deben adoptar medidas para limitar la propagación y prevenir la recurrencia de la infección. La mejora en las instalaciones, la optimización de las medidas de higiene a nivel de granja, y fomentar la salud animal mediante la prevención de enfermedades, podrían reducir la emergencia de microorganismos resistentes. Realizar un correcto manejo de sistemas de entrada y salida de animales para facilitar la limpieza y desinfección de las explotaciones, estrategias de vacunación; si estas están disponibles, aplicar una correcta estrategia de alimentación basada en la edad de los animales, sobre todo en la etapa del destete, son algunas de las recomendaciones dadas por las

directrices para el uso prudente de antimicrobianos en medicina veterinaria (Diario Oficial, 2015). Esto puede favorecer la reducción de la necesidad del uso de antimicrobianos a nivel preventivo. No debiéndose aplicar terapéutica como norma general, sino más bien evaluando cada caso en particular según el nivel sanitario de la explotación.

En nuestra opinión, los antimicrobianos son una herramienta fundamental para una producción de animales eficiente, sostenible y rentable económicamente. Por lo tanto, es necesario revisar exhaustivamente los programas de medicina preventiva establecidos para el control de enfermedades bacterianas. Además es necesario reducir su uso únicamente a nivel terapéutico después de un buen diagnóstico de las enfermedades en las distintas etapas de crianza de los animales, del aislamiento del patógeno y de la medición de la sensibilidad del microorganismo a los distintos antimicrobianos. También es importante limitar las practicas del uso de antibióticos críticos para la salud humana a los casos en que el diagnóstico microbiológico y las pruebas de sensibilidad hayan determinado que no será eficaz ningún otro tipo de agente antimicrobiano. Si la terapia no puede basarse en pruebas de laboratorio (FAO, 2004) y esto es algo que ocurre muy frecuentemente, el criterio clínico se vuelve esencial y, combinado con el conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del antimicrobiano elegido, pueden de igual forma conducir al éxito terapéutico.

Políticas estrictas de uso de antibióticos se deben implementar en los animales de granja, con el fin de preservar el uso de dichos antimicrobianos de importancia crítica para la salud humana (Diario Oficial, 2015). Debe existir la vigilancia continua a nivel de medicina humana y medicina

veterinaria, y el seguimiento de resistencias a los antibióticos en bacterias patógenas, zoonóticas e indicadoras (Diario Oficial, 2015). La implementación de medidas aisladas o mal coordinadas no son eficaces, siendo imprescindible la instauración de programas a escala nacional e internacional, con respuesta de los diferentes sectores que pueden estar relacionados con la salud pública, con el objetivo de recopilar datos, como el consumo de antibióticos en personas y animales en tiempo oportuno, y que sean comparables entre sectores. Además es necesaria la difusión, formación y educación no tan solo de las personas que están relacionadas con el área de la salud pública, sino de la población en general, ya que existe un sector de esta que desconoce la gravedad del uso inapropiado de los antimicrobianos. Y por último, la implementación de legislación nacional e internacional que impida la dispensación ilegal de agentes antibióticos tanto en el sector de la salud humana como en el veterinario (Diario Oficial, 2015).

Por otra parte en el ámbito de la investigación aún nos queda mucho por descubrir. Son necesarios estudios en profundidad en explotaciones en las que se investiguen aquellos tratamientos con menor impacto en la microbiota y menor efecto en la emergencia de resistencias. El diseño de estudios que puedan identificar otros factores de riesgo asociados con la persistencia de los mecanismos de resistencia y el diseño de intervenciones que minimicen la recirculación de las cepas resistentes y/o plásmidos dentro de las granjas, incluyendo granjas donde el uso de los antimicrobianos sea escaso. Todo ello en beneficio para afrontar con mayor éxito el control del riesgo derivado de la aparición de resistencia antimicrobiana y sobretodo de microorganismos multirresistentes.

*“No importa lo que tengas o no tengas, lo único que importa es con
cuanta facilidad dejas ir lo que tenga que irse” Y.B.*



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han detectado cepas de *E. coli* y *Salmonella* RC en lechones procedentes de granjas convencionales de porcino antes de administrarles ningún tipo de tratamiento antimicrobiano, por lo tanto, estas cepas están circulando en las granjas.
2. Los tratamientos con antibióticos betalactámicos por vía parenteral con ceftiofur, por vía oral con amoxicilina, y en ausencia de otro tipo de antimicrobianos, fueron factores de riesgo para incrementar la prevalencia de *E. coli* RC. Este riesgo se limita al período de tratamiento y, en ausencia de la presión selectiva de dichos antimicrobianos, no se detectaron *E. coli* RC.
3. En granjas convencionales existen otros factores de riesgo involucrados en la presencia de *E. coli* RC en los animales, tales como, la presencia en las madres y el uso de una combinación de otros antimicrobianos, que podrían haber influido en la persistencia de *E. coli* RC con fenotipos de multirresistencia al finalizar el ciclo productivo.
4. La carga inicial de *E. coli* RC, es independiente del tratamiento aplicado, y depende principalmente de la granja de origen. Además, la edad de los lechones reduce la proporción de animales positivos para *E. coli* RC, así como los recuentos de *E. coli* RC a nivel individual.
5. Los recuentos demostraron que la población de *E. coli* RC se incrementó en granjas tratadas con ceftiofur con respecto a la población total de *E. coli*. Este incremento fue transitorio y estuvo limitado a la duración del tratamiento.

6. El tratamiento con ceftiofur no fue un factor de riesgo en la emergencia y persistencia de cepas de *Salmonella* RC.
7. La presencia de *Salmonella* con fenotipos de multirresistencia a diferentes familias de antimicrobianos, puede estar asociado a la utilización de diversas familias de estos fármacos en los programas de medicina preventiva. Esto puede suponer un riesgo para la salud pública si estas cepas multirresistentes llegaran a introducirse en la cadena alimentaria.
8. Se han descrito una diversidad de genes de resistencia a cefalosporinas en *E. coli* y *Salmonella* en cerdos procedentes de granjas convencionales. Estos son similares a los que circulan en cepas aisladas de humanos. Por tanto, estos animales pueden suponer un riesgo potencial para la diseminación de microorganismos resistentes y se puede decir que son un reservorio de genes de resistencia.
9. Los experimentos de conjugación y transformación revelaron que los plásmidos encontrados en *E. coli* y *Salmonella* RC eran transferibles y pertenecían a las mismas familias de incompatibilidad plasmídica, descritas en cepas de origen humano. Además, estos plásmidos transfirieron genes de resistencia a familias de antimicrobianos no relacionados con los betalactámicos, por lo que la selección de cepas RC puede ser debida al uso de programas de medicina preventiva.

“Las tres leyes de la prosperidad son: Se amable con todos. No hables mal de otros No hables mal de ti mismo” Y.B.



REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Acha P., S.B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera edición. En Organización panamericana de la salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización mundial de la salud.
- Agerso, Y., Aarestrup, F.M., Pedersen, K., Seyfarth, A.M., Struve, T., Hasman, H., 2012, Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother* 67, 582-588.
- Ahmed, N., Dobrindt, U., Hacker, J., Hasnain, S.E., 2008, Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Microbiol* 6, 387-394.
- Amabile-Cuevas, C.F., Chicurel, M.E., 1992, Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70, 189-199.
- Ambler, R.P., 1980, The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289, 321-331.
- Amezcuca, R., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Gyles, C., Fairbrother, J.M., 2002, Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can J Vet Res* 66, 73-78.
- Anderson, E.S., Threlfall, E.J., Carr, J.M., McConnell, M.M., Smith, H.R., 1977, Clonal distribution of resistance plasmid-carrying *Salmonella* Typhimurium, mainly in the Middle East. *J Hyg (Lond)* 79, 425-448.
- Andersson, D.I., Levin, B.R., 1999, The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2, 489-493.
- Anjum, M.F., Choudhary, S., Morrison, V., Snow, L.C., Mafura, M., Slickers, P., Ehrlich, R., Woodward, M.J., 2011, Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. *J Antimicrob Chemother* 66, 550-559.

- Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., Aarestrup, F.M., 1997, Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med* 31, 95-112.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006, Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14, 176-182.
- Baquero, F., 2004, From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2, 510-518.
- Baquero F, B.J., Martínez JL 2002, Mutación y resistencia a antibióticos. *Investigación y ciencia* 315, 72-78.<http://www.redcientifica.com/pdf/doc200511240042.pdf>.
- Barrow, P.A., Huggins, M.B., Lovell, M.A., 1994, Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect Immun* 62, 4602-4610.
- Barton, B.M., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., 1995, A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 226, 235-240.
- Barton, M.D., 2014, Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol* 19, 9-15.
- Bencomo, A., 2014, Manual de enfermedades más comunes del cerdo. <http://es.slideshare.net/FernelyPlazas/manual-de-enfermedades-más-comunes-del-cerdo>
- Bennett, P.M., 2008, Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S347-357.
- Bergstrom, C.T., Lipsitch, M., Levin, B.R., 2000, Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics* 155, 1505-1519.
- Biedenbach, D.J., Toleman, M., Walsh, T.R., Jones, R.N., 2006, Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 54, 13-21.

- Bielak, E., Bergenholtz, R.D., Jorgensen, M.S., Sorensen, S.J., Hansen, L.H., Hasman, H., 2011, Investigation of diversity of plasmids carrying the *bla*TEM-52 gene. *J Antimicrob Chemother* 66, 2465-2474.
- Blanc, V., 2007. Caracterización de cepas y plasmidos de *Enterobacteriaceae* portadoras de Beta-Lactamasas espectro extendido. Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona.
- Blanc, V., Cortes, P., Mesa, R.J., Miro, E., Navarro, F., Llagostera, M., 2008, Characterisation of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamase and CMY-2 in *Escherichia coli* isolated from animal farms. *Int J Antimicrob Agents* 31, 76-78.
- Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miro, E., Navarro, F., Cortes, P., Llagostera, M., 2006, ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* 118, 299-304.
- Blood, D., 2002, Manual de medicina veterinaria. 9º edición.
- BOE, 2013a, Decisión de ejecución de la comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos Diario oficial de la unión europea L 303/26.
- BOE, 2013b, Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. BOE núm. 140, de 12 de junio de 2013, páginas 44289 a 44292
- Bonnet, R., 2004, Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1-14.
- Boot, M., Raadsen, S., Savelkoul, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C., 2013, Rapid plasmid replicon typing by real time PCR melting curve analysis. *BMC Microbiol* 13, 83.
- Bortolaia, V., Guardabassi, L., Trevisani, M., Bisgaard, M., Venturi, L., Bojesen, A.M., 2010, High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1623-1626.

- Bradford, P.A., 2001, Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14, 933-951, table of contents.
- Briales, A., Rodriguez-Martinez, J.M., Velasco, C., de Alba, P.D., Rodriguez-Bano, J., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., 2012, Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 39, 431-434.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Porrero, M.C., Dominguez, L., Torres, C., 2005, Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1262-1264.
- Brinas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., Garcia, M., Dominguez, L., Torres, C., 2003, Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2056-2058.
- Brolund, A., Wisell, K.T., Edquist, P.J., Elfstrom, L., Walder, M., Giske, C.G., 2010, Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired *AmpC* in *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Methods* 82, 229-233.
- Burow, E., Simoneit, C., Tenhagen, B.A., Kasbohrer, A., 2014, Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*--a systematic review. *Prev Vet Med* 113, 364-375.
- Bush, K., 1989, Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 33, 264-270.
- Bush, K., Jacoby, G.A., 2010, Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 969-976.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995, A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1211-1233.

- Callens, B., Faes, C., Maes, D., Catry, B., Boyen, F., Francoys, D., de Jong, E., Haesebrouck, F., Dewulf, J., 2015, Presence of antimicrobial resistance and antimicrobial use in sows are risk factors for antimicrobial resistance in their offspring. *Microb Drug Resist* 21, 50-58.
- Callens, B., Persoons, D., Maes, D., Laanen, M., Postma, M., Boyen, F., Haesebrouck, F., Butaye, P., Catry, B., Dewulf, J., 2012, Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Prev Vet Med* 106, 53-62.
- Calvo J., C.R., Fernández Cuenca F., Mirelis B., Navarro F. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos
- Cameron-Veas, K., Moreno, M.A., Fraile, L., Migura-García, L., 2016, Shedding of cephalosporin resistant *Escherichia coli* in pigs from conventional farms after early treatment with antimicrobials. *Vet J* 211, 21-25.
- Cameron-Veas, K., Sola-Gines, M., Moreno, M.A., Fraile, L., Migura-García, L., 2015, Impact of the use of beta-lactam antimicrobials on the emergence of *Escherichia coli* isolates resistant to cephalosporins under standard pig-rearing conditions. *Appl Environ Microbiol* 81, 1782-1787.
- Canton, R., 2009, Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 1, 20-25.
- Canton, R., 2010, [Interpretive reading of the antibiogram: a clinical necessity]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28, 375-385.
- Canton, R., Coque, T.M., 2006, The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9, 466-475.
- Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M., 2008, Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1, 144-153.
- Carattoli, A., 2008, Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1, 117-123.

- Carattoli, A., 2009, Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2227-2238.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005, Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63, 219-228.
- Cattoir, V., Nordmann, P., 2009, Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 16, 1028-1046.
- Cattoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Soussy, C.J., Nordmann, P., 2008, Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 14, 231-237.
- Cavaco, L.M., Abatih, E., Aarestrup, F.M., Guardabassi, L., 2008a, Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3612-3616.
- Cavaco, L.M., Frimodt-Moller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L., Aarestrup, F.M., 2008b, Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist* 14, 163-169.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000, Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013, The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5, 58-65.
- Cloekaert, A., Praud, K., Lefevre, M., Doublet, B., Pardos, M., Granier, S.A., Brisabois, A., Weill, F.X., 2010, *Incl1* plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-1} in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 4484-4486.

- CLSI, 2008, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100-S18 CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- Collazos, J.A., García, C, Carvajal, A., Rubio, P 2013. Caracterización de la infección por varios serotipos de *Salmonella*.
- Collignon, P., Aarestrup, F.M., 2007, Extended-spectrum beta-lactamases, food, and cephalosporin use in food animals. *Clin Infect Dis* 44, 1391-1392.
- Collignon, P., Aarestrup, F.M., Irwin, R., McEwen, S., 2013, Human deaths and third-generation cephalosporin use in poultry, Europe. *Emerg Infect Dis* 19, 1339-1340.
- Collignon, P., Powers, J.H., Chiller, T.M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F.M., 2009, World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin Infect Dis* 49, 132-141.
- Cortes, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, M., Lopez, C., Andreu, A., Navarro, F., Alonso, M.P., Bou, G., Blanco, J., Llagostera, M., 2010, Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol* 76, 2799-2805.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2006, Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 58, 1311-1312.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., Maas, W.K., 1988, Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 52, 375-395.
- CRSA-MAGRAMA, 2012, Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas.
- D'Costa, V.M., Griffiths, E., Wright, G.D., 2007, Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr Opin Microbiol* 10, 481-489.

- Datta, N., Hedges, R.W., 1971, Compatibility groups among *fi* R factors. *Nature* 234, 222-223.
- Datta, N., Hedges, R.W., 1972, R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 123, 849-852.
- Datta, N., Hughes, V.M., 1983, Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 306, 616-617.
- Davies, J., Davies, D., 2010, Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 417-433.
- Daza-Perez, R., 1998, Resistencia bacteriana antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la practica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 22, 57-67.
- Diario Oficial, U.E., 2015, Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria. Comunicación de la comisión (2015/C 299/04) [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A52015XC0911\(01\)](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A52015XC0911(01)).
- Diaz, M.A., Hernandez-Bello, J.R., Rodriguez-Bano, J., Martinez-Martinez, L., Calvo, J., Blanco, J., Pascual, A., 2010, Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* 48, 2840-2845.
- Dierikx, C., van der Goot, J., Fabri, T., van Essen-Zandbergen, A., Smith, H., Mevius, D., 2013, Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother* 68, 60-67.
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., Mevius, D., 2010, Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* 145, 273-278.
- Doi, Y., Paterson, D.L., Egea, P., Pascual, A., Lopez-Cerero, L., Navarro, M.D., Adams-Haduch, J.M., Qureshi, Z.A., Sidjabat, H.E., Rodriguez-Bano, J., 2010, Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect* 16, 33-38.

- Dubnau, E., Maas, W.K., 1968, Inhibition of replication of an F'lac episome in Hfr cells of *Escherichia coli*. J Bacteriol 95, 531-539.
- Dunlop, R.H., McEwen, S.A., Meek, A.H., Clarke, R.C., Black, W.D., Friendship, R.M., 1998, Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. Prev Vet Med 34, 283-305.
- Duyan, S., Kilic, A., Yilmaz, S., Ardic, N., 2015. Rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases by flow cytometry method. Mikrobiyol Bul 49, 600-608.
- Edsall, G., Gaines, S., Landy, M., Tigertt, W.D., Sprinz, H., Trapani, R.J., Mandel, A.D., Benenson, A.S., 1960, Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. I. Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella typhosa*. J Exp Med 112, 143-166.
- EFSA-ECDC, 2012, European Union Summary Report Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union 2010. EFSA Journal. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1203-SUR-ECDC-EFSA-report-antimicrobial-resistance.pdf> 10.
- EFSA-ECDC, 2012b, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1203ECDC-EFSA-zoonoses-food-borne-report.pdf>.
- EFSA-ECDC, 2014a, The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014.
- EFSA-ECDC, 2014b, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreak in 2012. *EFSA Journal* 12(2):3547.
- EFSA-ECDC, 2016, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 14(2):4380.

- EFSA 2014. Situación de las zoonosis en Europa y en España. In Informe de la autoridad Europea de seguridad alimentaria (España, Instituto de salud Carlos III (ISCIII)), pp. 43-55.<http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/866/1016>.
- EFSA, 2016, The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-zoonotic-bacteria-humans-animals-food-eu-summary-report-2014.pdf>.
- EFSA, ECDC, 2011, The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA Journal* 9(7):2154.
- EFSA, ECDC, 2013, The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA journal* 11(5):3196.
- EFSA, ECDC, 2016, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 14(2):4380.
- EMA, 1999, Committee for veterinary medicinal products- Cefquinome (Extension pigs). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits__Report/2009/11/WC500011890.pdf.
- EMA, 2009, Naxcel-Ceftiofur. http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000079/WC500065941.pdf.
- EMA, 2015, Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013.
- Escudero, E., Vinue, L., Teshager, T., Torres, C., Moreno, M.A., 2010, Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Res Vet Sci* 88, 83-87.

- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P.A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L.H., Guenther, S., 2010, Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother* 65, 651-660.
- FAO, 2004, Uso de antimicrobianos en animales de consumo <http://www.fao.org/3/a-y5468s.pdf>.
- FAO, 2011, Prevencion de *E. coli* en los alimento. <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf>.
- Farzan, A., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Warriner, K., Poppe, C., Klotins, K., 2006, Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. *Prev Vet Med* 73, 241-254.
- Folster, J.P., Pecic, G., McCullough, A., Rickert, R., Whichard, J.M., 2011, Characterization of *bla*(CMY)-encoding plasmids among *Salmonella* isolated in the United States in 2007. *Foodborne Pathog Dis* 8, 1289-1294.
- Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O., Dantas, G., 2012, The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107-1111.
- Fraile, L., 2014, Antimicrobial therapy in swine medicine: A practical approach.
- Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C., de la Cruz, F., 2004, A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28, 79-100.
- Gagliotti, C., Balode, A., Baquero, F., Degener, J., Grundmann, H., Gur, D., Jarlier, V., Kahlmeter, G., Monen, J., Monnet, D.L., Rossolini, G.M., Suetens, C., Weist, K., Heuer, O., Participants, E.A.-N., 2011, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Euro Surveill* 16.
- 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* 170, 1-9.

- García de Lomas J, N.D., Gimeno C. , 1998, Mecanismo de acción de los antibióticos. En: Tratamiento Antimicrobiano. información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud Vol 22–Nº3
- García, P., Hopkins, K.L., García, V., Beutlich, J., Mendoza, M.C., Threlfall, J., Mevius, D., Helmuth, R., Rodicio, M.R., Guerra, B., Med-Vet-Net, W.P.P.G., 2014, Diversity of plasmids encoding virulence and resistance functions in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 4,[5],12:i:- strains circulating in Europe. PLoS One 9, e89635.
- Garrido, V., Sanchez, S., San Roman, B., Zabalza-Barangua, A., Diaz-Tendero, Y., de Frutos, C., Mainar-Jaime, R.C., Grillo, M.J., 2014, Simultaneous infections by different *Salmonella* strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs. BMC Vet Res 10, 59.
- Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M., Wellington, E.M., 2005, Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. Antimicrob Agents Chemother 49, 1802-1807.
- Geser, N., Stephan, R., Kuhnert, P., Zbinden, R., Kaeppli, U., Cernela, N., Haechler, H., 2011, Fecal Carriage of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland. J Food Prot 74, 446-449.
- Gilbert, P., McBain, A.J., 2003, Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 16, 189-208.
- Gniadkowski, M., 2008, Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. Clin Microbiol Infect 14 Suppl 1, 11-32.
- Gomes-Neves, E., Antunes, P., Manageiro, V., Gartner, F., Canica, M., da Costa, J.M., Peixe, L., 2014, Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. Vet Microbiol 168, 229-233.
- Gomes-Neves, E., Antunes, P., Tavares, A., Themudo, P., Cardoso, M.F., Gartner, F., Costa, J.M., Peixe, L., 2012, *Salmonella* cross-contamination in swine abattoirs in Portugal: Carcasses, meat and meat handlers. Int J Food Microbiol 157, 82-87.

- Goncalves, A., Torres, C., Silva, N., Carneiro, C., Radhouani, H., Coelho, C., Araujo, C., Rodrigues, J., Vinue, L., Somalo, S., Poeta, P., Igrejas, G., 2010, Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm. *Foodborne Pathog Dis* 7, 1569-1573.
- Gonzalez-Sanz, R., Herrera-Leon, S., de la Fuente, M., Arroyo, M., Echeita, M.A., 2009, Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and *AmpC*-type beta-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *J Antimicrob Chemother* 64, 1181-1186.
- Gotoh, T., Sugimoto, N., Pallini, A., Knapp, M., Hernandez-Suarez, E., Ferragut, F., Ho, C.C., Migeon, A., Navajas, M., Nachman, G., 2010, Reproductive performance of seven strains of the tomato red spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) at five temperatures. *Exp Appl Acarol* 52, 239-259.
- Gotz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschape, H., van Elsas, J.D., Smalla, K., 1996, Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62, 2621-2628.
- Grimont, P.A.a.F.X.W., 2007, Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In: I. P. a. WHO. Institute Pasteur and World Health Organization. Collaboration Centre for Reference Research on *Salmonella*.
- Gstalter, M.E., Faelen, M., Mine, N., Top, E.M., Mergeay, M., Couturier, M., 2003, Replication functions of new broad host range plasmids isolated from polluted soils. *Res Microbiol* 154, 499-509.
- Guardabassi, L., 2013, Sixty years of antimicrobial use in animals: what is next? *Vet Rec* 173, 599-603.
- Guardabassi, L.y.C., C., 2006, Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Ed: Aarestrup, F. ASM Press, Washington, D. C. , 1-18.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemuhl, J., Grimont, P.A., Weill, F.X., 2010, Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 161, 26-29.
- Haines, A.S., Cheung, M., Thomas, C.M., 2006, Evidence that IncG (IncP-6) and IncU plasmids form a single incompatibility group. *Plasmid* 55, 210-215.

-
- Hansen, K.H., Bortolaia, V., Damborg, P., Guardabassi, L., 2014, Strain diversity of CTX-M-producing *Enterobacteriaceae* in individual pigs: insights into the dynamics of shedding during the production cycle. *Appl Environ Microbiol* 80, 6620-6626.
- Hansen, K.H., Damborg, P., Andreasen, M., Nielsen, S.S., Guardabassi, L., 2013, Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 79, 794-798.
- Hanson, N.D., Sanders, C.C., 1999, Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm Des* 5, 881-894.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., Aarestrup, F.M., 2005, beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 56, 115-121.
- Hauser, E., Hebner, F., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Prager, R., Schroeter, A., Rabsch, W., Fruth, A., Malorny, B., 2011, Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. *Int J Food Microbiol* 151, 141-149.
- Heininger, A., Binder, M., Schmidt, S., Unertl, K., Botzenhart, K., Doring, G., 1999, PCR and blood culture for detection of *Escherichia coli* bacteremia in rats. *J Clin Microbiol* 37, 2479-2482.
- Hering, J., Hille, K., Fromke, C., von Munchhausen, C., Hartmann, M., Schneider, B., Friese, A., Roesler, U., Merle, R., Kreienbrock, L., 2014, Prevalence and potential risk factors for the occurrence of cefotaxime resistant *Escherichia coli* in German fattening pig farms-- a cross-sectional study. *Prev Vet Med* 116, 129-137.
- Heritage, J., M'Zali, F.H., Gascoyne-Binzi, D., Hawkey, P.M., 1999, Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 44, 309-318.

- Hirakata, Y., Matsuda, J., Miyazaki, Y., Kamihira, S., Kawakami, S., Miyazawa, Y., Ono, Y., Nakazaki, N., Hirata, Y., Inoue, M., Turnidge, J.D., Bell, J.M., Jones, R.N., Kohno, S., Participants, S.A.-P., 2005, Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis* 52, 323-329.
- Holmberg, S.D., Solomon, S.L., Blake, P.A., 1987, Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Rev Infect Dis* 9, 1065-1078.
- Hope, R., Potz, N.A., Warner, M., Fagan, E.J., Arnold, E., Livermore, D.M., 2007, Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 59, 110-113.
- Hopkins, K.L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S.A., Lucarelli, C., Porrero, M.C., Jakubczak, A., Threlfall, E.J., Mevius, D.J., 2010, Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill* 15, 19580.
- Hornish, R.E., Kotarski, S.F., 2002, Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem* 2, 717-731.
- Hunter, P.A., Dawson, S., French, G.L., Goossens, H., Hawkey, P.M., Kuijper, E.J., Nathwani, D., Taylor, D.J., Teale, C.J., Warren, R.E., Wilcox, M.H., Woodford, N., Wulf, M.W., Piddock, L.J., 2010, Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J Antimicrob Chemother* 65 Suppl 1, i3-17.
- Jacoby, G.A., Munoz-Price, L.S., 2005, The new beta-lactamases. *N Engl J Med* 352, 380-391.
- Jiang, X., Yang, H., Dettman, B., Doyle, M.P., 2006, Analysis of fecal microbial flora for antibiotic resistance in ceftiofur-treated calves. *Foodborne Pathog Dis* 3, 355-365.
- Jorgensen, C.J., Cavaco, L.M., Hasman, H., Emborg, H.D., Guardabassi, L., 2007, Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *J Antimicrob Chemother* 59, 1040-1042.
- Katouli, M., Lund, A., Wallgren, P., Kuhn, I., Soderlind, O., Mollby, R., 1995, Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods. *Appl Environ Microbiol* 61, 778-783.

- Kelly, B.G., Vespermann, A., Bolton, D.J., 2009, The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* 47, 951-968.
- Kempf, I., Jouy, E., Granier, S.A., Chauvin, C., Sanders, P., Salvat, G., Madec, J.Y., 2015, Comment on "impact of antibiotic use in the swine industry", by Mary D. Barton [*Curr. Opin. Microbiol.* 19 (June 2014) 9-15]. *Curr Opin Microbiol* 26, 137-138.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S., 1983, Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11, 315-317.
- 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.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Kasbohrer, A., Kreienbrock, L., Roesler, U., 2013, Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Appl Environ Microbiol* 79, 4815-4820.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., Rosler, U., 2014, Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* 172, 519-527.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O., 2013, Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13, 1057-1098.
- Lee, K.E., Lim, S.I., Choi, H.W., Lim, S.K., Song, J.Y., An, D.J., 2014, Plasmid-mediated AmpC beta-lactamase (CMY-2) gene in *Salmonella* Typhimurium isolated from diarrheic pigs in South Korea. *BMC Res Notes* 7, 329.

- Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K.L., Clifton-Hadley, F.A., Teale, C.J., Foster, A., Barker, L., Threlfall, E.J., Davies, R.H., 2006, Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* 44, 1630-1634.
- 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., Threlfall, J., 2012, The public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) 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*.
- Lipsitch, M., 2001, The rise and fall of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology* 9, 438-444.
- Liu, Y., Yang, Y., Zhao, F., Fan, X., Zhong, W., Qiao, D., Cao, Y., 2013, Multi-drug resistant gram-negative enteric bacteria isolated from flies at Chengdu Airport, China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44, 988-996.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16, 161-168.
- Livermore, D.M., 1991, Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis Suppl* 78, 7-16.
- Livermore, D.M., 1995, beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8, 557-584.
- Livermore, D.M., 2008, Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1, 3-10.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N., 2007, *CTX-M*: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59, 165-174.
- Looft, T., Allen, H.K., 2012a, Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes* 3, 463-467.

- Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., Stanton, T.B., 2012b, In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1691-1696.
- MacDougall, C., Polk, R.E., 2005, Antimicrobial stewardship programs in health care systems. *Clin Microbiol Rev* 18, 638-656.
- 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. *Clin Microbiol Infect* 18, 268-281.
- MAGRAMA., 2015, EUROSTAT y estadísticas del MAGRAMA.S.G. Productos Ganaderos.
http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercadosganaderos/caracterizaciondelsectorporcinoespanolano2015_tcm7-423382.pdf.
- Manteca, X., Temple, D., Mainau, E., 2014, Impacto económico del estrés en el transporte porcino. http://www.fawec.org/media/com_lazypdf/pdf/fs9-es.pdf.
- Marin, M., Gudiol, F., 2003, [beta-Lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21, 42-55.
- Maron, D.F., Smith, T.J., Nachman, K.E., 2013, Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health* 9, 48.
- Marshall, W.F., Blair, J.E., 1999, The cephalosporins. *Mayo Clin Proc* 74, 187-195.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A., 1998, Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351, 797-799.
- Martinez, J.L., 2009, The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 276, 2521-2530.
- Martinez, J.L., Coque, T.M., Baquero, F., 2015, What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol* 13, 116-123.

-
- Martinez, L. 2006. Mecanismos de adquisición de resistencia a los antibióticos (Santander. España).
- Mathew, A.G., Garner, K.N., Ebner, P.D., Saxton, A.M., Clift, R.E., Liamthong, S., 2005, Effects of antibiotic use in sows on resistance of *E. coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium in their offspring. Foodborne Pathog Dis 2, 212-220.
- Matute, W., 2008, Antimicrobianos. <http://www.bvs.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMVol5-2-2008-11.pdf>.
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortes, P., Gonzalez, J.J., Lavilla, S., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F., 2006, Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). J Antimicrob Chemother 58, 211-215.
- Meunier, D., Jouy, E., Lazizzera, C., Kobisch, M., Madec, J.Y., 2006, CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. Int J Antimicrob Agents 28, 402-407.
- Moon, H.W., Schneider, R.A., Moseley, S.L., 1986, Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. Am J Vet Res 47, 210-212.
- Moreno M, C., González E, R.n., Beltrán, C., 2009, Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Revista de otorrinolaringología y cirugía-a de cabeza y cuello 69, 185-192.
- Moreno, M.A., 2014a, Opinions of Spanish pig producers on the role, the level and the risk to public health of antimicrobial use in pigs. Res Vet Sci 97, 26-31.
- Moreno, M.A., 2014b, Survey of quantitative antimicrobial consumption per production stage in farrow-to-finish pig farms in Spain. Vet Rec Open 1, e000002.
- Moreno, M.A., 2014c, Survey of quantitative antimicrobial consumption per production stage in farrow-to-finish pig farms in Spain. Veterinary Record.

- Moreno, M.A., Teshager, T., Porrero, M.A., Garcia, M., Escudero, E., Torres, C., Dominguez, L., 2007, Abundance and phenotypic diversity of *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in faeces from healthy food animals after slaughter. *Vet Microbiol* 120, 363-369.
- Muniesa, M., Hammerl, J.A., Hertwig, S., Appel, B., Brussow, H., 2012, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol* 78, 4065-4073.
- Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2008, Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1, 42-52.
- Nnalue, N.A., 1991, Relevance of inoculation route to virulence of three *Salmonella* spp. strains in mice. *Microb Pathog* 11, 11-18.
- Novick, R.P., 1987, Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 51, 381-395.
- Nowakowski, M.A., Inskeep, P.B., Risk, J.E., Skogerboe, T.L., Benchaoui, H.A., Meinert, T.R., Sherington, J., Sunderland, S.J., 2004, Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin, a new triamilide antibiotic, in cattle. *Vet Ther* 5, 60-74.
- OIE, 2008, Manual de la OIE sobre animales terrestre. [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf es 2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf).
- Orskov, F., Orskov, I., 1992, *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 38, 699-704.
- Pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Pepin, M., Popoff, M., 1988, [Ovine salmonellosis caused by *Salmonella abortus ovis*]. *Ann Rech Vet* 19, 221-235.
- Pastrana A, M.J., Rincón M 2005. La salmonelosis porcina y su importancia en la cadena de producción (Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Unidad de Diagnóstico Veterinario. Medicina Porcina. ICA-CEISA. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia).
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005, Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18, 657-686.
- Pennington, H., 2010, *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376, 1428-1435.

-
- Perez-Perez, F.J., Hanson, N.D., 2002, Detection of plasmid-mediated *AmpC* beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40, 2153-2162.
- Perez, G., 1997, Tratamiento de las infecciones urinarias, En: Tratamiento Antimicrobiano. Emisa, Madrid, 429-444. <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- Pezzella, C., Ricci, A., DiGiannatale, E., Luzzi, I., Carattoli, A., 2004, Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 903-908.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A., 2002, Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1-11.
- Pires, S., de Knecht, L., Hald, T., 2011, Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infection in the European Union. Scientific/Technical Report submitted to EFSA. EFSA-Q-2010-00685.
- Pociello, V.B., 2007, Caracterización de cepas y plásmidos de enterobacterias portadoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y Microbiología.
- Poeta, P., Radhouani, H., Igrejas, G., Goncalves, A., Carvalho, C., Rodrigues, J., Vinue, L., Somalo, S., Torres, C., 2008, Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl Environ Microbiol* 74, 7439-7441.
- Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Gheesling, L.L., 2004, Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 155, 568-570.
- Ramos, S., Silva, N., Canica, M., Capelo-Martinez, J.L., Brito, F., Igrejas, G., Poeta, P., 2013a, High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. *J Sci Food Agric* 93, 517-526.

- Ramos, S., Silva, N., Dias, D., Sousa, M., Capelo-Martinez, J.L., Brito, F., Canica, M., Igrejas, G., Poeta, P., 2013b, Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs at slaughter level in Portugal. *Foodborne Pathog Dis* 10, 74-79.
- Randall, L.P., Clouting, C., Horton, R.A., Coldham, N.G., Wu, G., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Teale, C.J., 2011, Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother* 66, 86-95.
- Rayamajhi, N., Cha, S.B., Shin, S.W., Jung, B.Y., Lim, S.K., Yoo, H.S., 2011, Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other *Enterobacteriaceae* isolates from South Korean farm animals. *Appl Environ Microbiol* 77, 3163-3166.
- Riano, I., Garcia-Campello, M., Saenz, Y., Alvarez, P., Vinue, L., Lantero, M., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Torres, C., 2009, Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clin Microbiol Infect* 15, 292-295.
- Riano, I., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Dominguez, L., Torres, C., 2006, Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *J Antimicrob Chemother* 58, 844-847.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006, Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3, 59-67.
- Richmond, M.H., Sykes, R.B., 1973, The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 9, 31-88.
- Rivas, K., Rivas, M., Davila, E., Rodríguez, M., 2002, Cefalosporinas: De la Primera a la Cuarta Generación. *Revista de la Facultad de Medicina* 25, 142-153.

- Rodriguez, I., Barownick, W., Helmuth, R., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Schroeter, A., Guerra, B., 2009, Extended-spectrum {beta}-lactamases and *AmpC* {beta}-lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. *J Antimicrob Chemother* 64, 301-309.
- Sabate, M., Navarro, F., Miro, E., Campoy, S., Mirelis, B., Barbe, J., Prats, G., 2002, Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*(CTX-M-9). *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2656-2661.
- Saenz, Y., Vinue, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martinez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C., 2010, Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol* 144, 493-497.
- San Ramon, B., Garrido, V., Grillo, M.J., 2013, *Molecular Vaccines*. © Springer-Verlag Wien 2013, Chapter 19:329-342. M Giese (ed) pp. 1.
- Sanders, C.C., 2001, Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 1, S1-8.
- Sawai, T., Mitsuhashi, S., Yamagishi, S., 1968, Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin. *Jpn J Microbiol* 12, 423-434.
- Schwartz, K.J., 2005, *Manual de enfermedades del porcino*. Suis. <https://www.3tres3.com/3tres3_common/tienda/doc/ManualEnfermSuis.pdf>.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T.R., 2001, Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* 17, 431-437.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gastra, W., 2010, Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* 65, 601-604.
- Seral Garcia, C., Pardos de la Gandara, M., Castillo Garcia, F.J., 2010, [Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28 Suppl 1, 12-18.

- Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miro, E., Gomez, J., Mirelis, B., 2000, *Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. J Clin Microbiol 38, 4676-4678.
- Singer, R.S., Patterson, S.K., Wallace, R.L., 2008, Effects of therapeutic ceftiofur administration to dairy cattle on *Escherichia coli* dynamics in the intestinal tract. Appl Environ Microbiol 74, 6956-6962.
- Sjolund, M., Backhans, A., Greko, C., Emanuelson, U., Lindberg, A., 2015, Antimicrobial usage in 60 Swedish farrow-to-finish pig herds. Prev Vet Med 121, 257-264.
- Smalla, K., Heuer, H., Gotz, A., Niemeyer, D., Krogerrecklenfort, E., Tietze, E., 2000, Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. Appl Environ Microbiol 66, 4854-4862.
- Smet, A., Rasschaert, G., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Butaye, P., Catry, B., Haesebrouck, F., Herman, L., Heyndrickx, M., 2011, In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. J Appl Microbiol 110, 541-549.
- Snoeyenbos, G., H., 1994, Aviar *Salmonellosis*. Handbook of Zoonoses, Second Edition, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Sola-Gines, M., Gonzalez-Lopez, J.J., Cameron-Veas, K., Piedra-Carrasco, N., Cerda-Cuellar, M., Migura-Garcia, L., 2015, Houseflies (*Musca domestica*) as Vectors for Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Spanish Broiler Farms. Appl Environ Microbiol 81, 3604-3611.
- Stecher, B., Maier, L., Hardt, W.D., 2013, 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. Nat Rev Microbiol 11, 277-284.
- Stokes, H.W., Gillings, M.R., 2011, Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. FEMS Microbiol Rev 35, 790-819.
- Strohl, W., 1997, Biotechnology of antibiotics. Drugs and The pharmaceutical sciences 2^o edicion.

-
- Sykes, R.B., Matthew, M., 1976, The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2, 115-157.
- Tadee, P., Boonkhot, P., Pornruangwong, S., Patchanee, P., 2015, Comparative phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. in pig farms and slaughterhouses in two provinces in northern Thailand. *PLoS One* 10, e0116581.
- Tafur, J.D.T., Julián Andrés, Villegas, María Virginia, 2008, Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infect.* [online] 12, 227-232.
- Taroco R, S.V., Vignoli R 2008. Temas de bacteriología y virología medica. Métodos de estudios de la sensibilidad antibiótica.
- Thomas, C.M., 2000, Paradigms of plasmid organization. *Mol Microbiol* 37, 485-491.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005, Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 521-524.
- Torres, C., 2012, La Resistencia bacteriana a los antibioticos, siete decadas despues de Fleming.
- Tragesser, L.A., Wittum, T.E., Funk, J.A., Winokur, P.L., Rajala-Schultz, P.J., 2006, Association between ceftiofur use and isolation of *Escherichia coli* with reduced susceptibility to ceftriaxone from fecal samples of dairy cows. *Am J Vet Res* 67, 1696-1700.
- Turnidge, J., Kahlmeter, G., Kronvall, G., 2006, Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 12, 418-425.
- Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D.J., Olsen, J.E., 2000, Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 125, 229-255.
- van Rennings, L., von Munchhausen, C., Otilie, H., Hartmann, M., Merle, R., Honscha, W., Kasbohrer, A., Kreienbrock, L., 2015, Cross-sectional study on antibiotic usage in pigs in Germany. *PLoS One* 10, e0119114.

- Vico, J.P., Rol, I., Garrido, V., San Roman, B., Grillo, M.J., Mainar-Jaime, R.C., 2011, Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *J Food Prot* 74, 1070-1078.
- Vila, J., Marti, S., Sanchez-Cespedes, J., 2007, Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 59, 1210-1215.
- Villa, L., Garcia-Fernandez, A., Fortini, D., Carattoli, A., 2010, Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 65, 2518-2529.
- Vinue, L., Jove, T., Torres, C., Ploy, M.C., 2011, Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int J Antimicrob Agents* 38, 526-529.
- von Wintersdorff, C.J., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H., Wolfs, P.F., 2016, Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 7, 173.
- Wang, J., Gibbons, J.F., McGrath, K., Bai, L., Li, F., Leonard, F.C., Stephan, R., Fanning, S., 2016, Molecular characterization of blaESBL-producing *Escherichia coli* cultured from pig farms in Ireland. *J Antimicrob Chemother*.
- Wasyl, D., 2014, Prevalence and characterization of quinolone resistance mechanisms in commensal *Escherichia coli* isolated from slaughter animals in Poland, 2009-2012. *Microb Drug Resist* 20, 544-549.
- Waters, V.L., 1999, Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci* 4, D433-456.
- Weese, J.S., Giguere, S., Guardabassi, L., Morley, P.S., Papich, M., Ricciuto, D.R., Sykes, J.E., 2015, ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *J Vet Intern Med* 29, 487-498.

- Weill, F.X., Lailler, R., Praud, K., Kerouanton, A., Fabre, L., Brisabois, A., Grimont, P.A., Cloeckaert, A., 2004, Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. J Clin Microbiol 42, 5767-5773.
- WHO, 2001, Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos.<<http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf>>.
- WHO, 2011, Critically important antimicrobials for human medicine, 3rd rev. World Health Organization. Geneva, Switzerland. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf?ua=1&ua=1.
- WHO, 2015, Temas de Salud: *Escherichia coli*. <http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/>.
- WHO 2016. Alerta Epidemiológica: Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas (Washington, D.C.).
- Woolhouse, M., Farrar, J., 2014, Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. Nature 509, 555-557.
- Wray, C., Sojka, W.J., 1977, Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. J Dairy Res 44, 383-425.
- Wray, C., Wray, A., 2000, *Salmonella* in domestic animals. <https://www.scribd.com/doc/57879391/Salmonella-in-Domestic-Animals>.
- Wright, G.D., 2007, The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nat Rev Microbiol 5, 175-186.
- Yoo, J.S., Byeon, J., Yang, J., Yoo, J.I., Chung, G.T., Lee, Y.S., 2010, High prevalence of extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from long-term care facilities in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 67, 261-265.
- Zurfluh, K., Jakobi, G., Stephan, R., Hachler, H., Nuesch-Inderbinen, M., 2014, Replicon typing of plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} in *Enterobacteriaceae* of animal, environmental and human origin. Front Microbiol 5, 555.

