



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Caracterización de los patrones de resistencia y sensibilidad a antibióticos  
en aislados de Escherichia coli de origen porcino: implicación en la salud pública.

Characterisation of antibiotics resistance and susceptibility patterns on  
porcine Escherichia coli isolates: implication on Public Health.

Autor/es

Jorge Ortega Moreno

Director/es

M<sup>a</sup> Carmen Simón Valencia

Facultad de Veterinaria

---

2023

## ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Abstract .....	3
3. Introducción.....	4
3.1. Los antibióticos: origen y evolución .....	4
3.2. El problema de la resistencia a antimicrobianos.....	5
3.3. Escherichia coli .....	8
4. Justificación y objetivos.....	11
5. Material y métodos .....	12
5.1. Población en estudio y obtención de muestras .....	12
5.2. Aislamiento e Identificación de E. coli .....	12
5.3. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos. Método de Difusión en disco (DD).....	13
5.4. Detección de E. coli productor de BLEEs. Método del DD (EUCAST, CLSI).....	13
5.5. Análisis de aislados de E. coli multirresistentes (MDR). .....	14
5.6. Método serológico de detección de E. coli O157:H7: uso de agar MacConkey-sorbitol y método de aglutinación con Acs específicos. ....	14
5.7. Búsqueda bibliográfica.....	14
5.8. Resultados estadísticos.....	14
6. Resultados y discusión .....	15
7. Mejoras y propuestas para el futuro.....	32
8. Conclusiones .....	33
9. Conclusions .....	34
10. Valoración personal .....	34
11. Bibliografía .....	35

## 1. Resumen

El presente trabajo pretende aportar más información sobre la resistencia a los antimicrobianos (RAM) de *Escherichia coli* aislados de explotaciones porcinas. En el estudio se utilizaron antibióticos de uso habitual en medicina humana y los habituales en las explotaciones porcinas. El muestreo se realizó periódicamente cada dos meses, durante 2 años (2021 y 2022), tanto de animales sanos como enfermos, lactantes, jóvenes y adultos. Las muestras rectales o de heces y nasales, de animales sanos y enfermos, se recibían en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas del departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y provenían de explotaciones pertenecientes a la Agrupación de Defensa Sanitaria (ADS) de Ágreda, Soria. El objetivo es conocer los niveles de resistencia a antibióticos de uso habitual en explotaciones porcinas y antibióticos de uso en medicina humana en una bacteria centinela como *E. coli*, y obtener una visión global relacionando la sanidad animal, la salud humana y el ecosistema.

Se recolectaron un total de 58 aislados de *E. coli* y los resultados muestran que las granjas analizadas poseen niveles de resistencia elevados a los antimicrobianos, principalmente a los usados en animales. Por otro lado, los resultados obtenidos con los antibióticos de importancia crítica o de uso restringido por su importancia en salud humana como el Meropenem (0%), Colistina (2,2%), Amoxicilina-clavulánico (4,4%), Aztreonam (8,9%), Marbofloxacin (12,1%), Enrofloxacin (17,2%), Ceftazidima (22,2%), Cefotaxima (24,4%) y Ciprofloxacin (26,7%), son resultados preocupantes (excepto con el meropenem), lo que pone en evidencia que, aunque ya detecta que en el ámbito ganadero se está intentando controlar el uso de antibióticos, todavía es necesario incidir en un uso específico pero siempre acompañado de nuevas medidas de prevención y manejo.

## 2. Abstract

This study aims to provide more information on the resistance to antimicrobials (RAM) of *Escherichia coli* isolated from pig farms. In the study, antibiotics commonly used in human medicine and those commonly used in pig farms were used. Sampling was carried out periodically every two months, for 2 years (2021 and 2022), both healthy and sick, lactating, young and adult animals. The rectal or fecal and nasal samples, from healthy and sick animals, were received in the Infectious Diseases laboratory of the Department of Animal Pathology of the Veterinary Faculty of Zaragoza and came from farms belonging to the Health Defense Group (ADS) of Agreda, Soria (Spain). The main object was to find out the levels of resistance to antibiotics commonly used in pig farms and antibiotics used in human medicine, in a sentinel bacterium such as *E. coli*, and to obtain a global vision relating animal health, human health and the ecosystem.

A total of 58 *E. coli* isolates were collected and the results show that the analyzed farms have high levels of resistance to antimicrobials, mainly those used in animals. In turn, the results obtained with critically important antibiotics, or restricted due to its important role in human medicine, such as Meropenem (0%), Colistin (2.2%) , Amoxicillin-clavulanic acid (4.4%), Aztreonam (8.9%), Marbofloxacin (12.1%), Enrofloxacin (17.2%), Ceftazidime (22.2%), Cefotaxime (24.4%) and Ciprofloxacin (26.7%), are worrisome results (except for Meropenem), which shows that, although it is already noticeable that the use of antibiotics is being controlled in the livestock sector, it is still necessary make an effort to apply its specific use but always accompanied by new prevention and management measures.

### 3. Introducción

#### 3.1. Los antibióticos: origen y evolución

Según la OMS y la OMSA, los antimicrobianos, son fármacos que actúan frente a microorganismos. Si nos referimos a fármacos frente a las bacterias, se debería denominar “antibacterianos”, si bien, y porque el término “antibiótico” se ha usado durante décadas como un sinónimo de antibacteriano, se admite su uso indistintamente. En este estudio se hablará de resistencia a los antibióticos, por ser de uso más común (OMS, 2017). Estos se utilizan para tratar y prevenir las infecciones bacterianas, acabando con las bacterias o deteniendo su multiplicación, reduciendo la mortalidad tanto en las personas como los animales. (OMS, 2017).

La resistencia antimicrobiana (RAM) aparece cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos dejan de responder eficazmente a estos medicamentos, dificultando los tratamientos de las infecciones y aumentando los riesgos de propagación de las enfermedades, su gravedad y la muerte. La resistencia a los antimicrobianos, se define como una pandemia silenciosa que provocará millones de muertes en exceso, mayor sufrimiento y un aumento de los costes de atención de salud, además de la pérdida de vidas de animales, con graves efectos en los medios de subsistencia y la seguridad alimentaria. El Banco Mundial ha estimado que, si no se hace frente al problema de la RAM, es posible que para 2050 la economía mundial haya perdido casi el 4% del producto interno bruto (PIB) anual y que las pérdidas serán aún mayores en los países de ingresos bajos y medianos que podría llevar a 28 millones de personas a la pobreza, la mayoría de ellas en los países en desarrollo (OMS, FAO, OIE, 2021).

La generalización del empleo de los antibióticos comenzó a partir de los años 50 del siglo pasado y cambió radicalmente las consecuencias de las enfermedades. Así, enfermedades infecciosas que habían sido grandes causas de muerte, como la tuberculosis, redujeron su gravedad y mortalidad. En las cirugías, permitiendo la realización de operaciones complejas y prolongadas sin un riesgo excesivo de infección, o la evolución de los trasplantes. Al mejorar la vida de los animales, la obtención de proteína animal se hizo más asequible a una importante parte de la población, y ha propiciado una vida mejor, más duradera y con más capacidad de defensa frente a infecciones (Frieri et al., 2017).

Los antibióticos se clasifican por sus mecanismos de acción en 4 grupos: (Uddin et al, 2021):

- Agentes que **inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana**, y afectan a la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana (penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos betalactámicos) y los glycopéptidos (vancomicina o bacitracina).

- Agentes que **afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal** entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la **subunidad 30S** (aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas) y los que actúan sobre la **subunidad 50S** (macrólidos, lincosamidas y anfenicoles y oxazolidonas).
- Los que afectan la síntesis **de los ácidos nucleicos** (quinolonas, rifampicinas).
- **Antimetabolitos:** que actúan sobre enzimas de la síntesis de ácido fólico: Sulfonamidas y Trimethoprim
- Los que actúan directamente **sobre la integridad de la membrana celular** del microorganismo (polimixina B y la polimixina E llamada colistina)

### 3.2. El problema de la resistencia a antimicrobianos

Las bacterias, al estar expuestas a un antibiótico, tienen la capacidad de desarrollar mecanismos que les permiten sobrevivir a la acción de los mismos. ~~(Ricciardi et al., 2016)~~. Estos fenómenos ocurren de manera natural a lo largo del tiempo o bien mediante la adquisición de genes de resistencia, además de la adquisición de variabilidad genética favoreciendo su evolución (OMS, 2017). La presión selectiva hace referencia a la presión a la que son sometidas las bacterias mediante la administración de antibióticos, favoreciendo la adquisición de resistencias para sobrevivir a estos fármacos (Bennet et al., 2015).

Khardori (2006) estudiaron colecciones de microorganismos, anteriores a la era de los antibióticos y concluyeron que antes eran más susceptibles a los antibióticos. Sin embargo, otro estudio (D'Costa et al, 2011) hizo un análisis de DNA procedente de sedimentos de permafrost (parte profunda del suelo de las regiones frías permanentemente helada) de 30.000 años de antigüedad y encontraron una amplia colección de genes que codifican para la resistencia a Beta-lactámicos, Tetraciclina y Glicopéptidos. Los estudios de la estructura y función del gen de resistencia a la vancomicina VanA, confirman su similitud a las variantes actuales. Sus resultados concluyen que la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural muy anterior a la presente presión selectiva por el uso clínico de los antibióticos.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), conocidas como la “Asociación Cuatripartita” se han unido para luchar frente a la amenaza que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa para los seres humanos, los animales, las plantas, los ecosistemas y los medios de vida (OMS, 2022).

Durante el siglo XX, se desarrollaron y descubrieron gran cantidad de nuevos antibióticos del grupo de los betalactámicos, tales como la meticilina, la oxacilina y la dicloxacilina. Sin embargo, en el Reino Unido se detectaron cepas de *Staphylococcus aureus* que eran resistentes a la meticilina (SARM), publicadas en 1961 (Jevons, 1961).

La respuesta bacteriana al "ataque" antibiótico es el principal ejemplo de adaptación bacteriana y clave para su evolución, gracias a una gran plasticidad genética de los patógenos bacterianos que desencadenan respuestas específicas que resultan en adaptaciones mutacionales, adquisición de material genético o alteración de la expresión génica que produce resistencia a gran cantidad de antibióticos (Munita et al., 2015).

No existe una única causa responsable al 100% de este problema, pero se pueden agrupar diferentes acciones:

- Sobreutilización de antimicrobianos y pautas de dosificación incorrectas: El consumo de antibióticos parece estar relacionado proporcionalmente a la generación de resistencia, y cualquier residuo del fármaco que se encuentre en contacto con la bacteria, puede desencadenar un cambio y originar resistencia (Gullberg et al., 2011).
- Incorrecta prescripción de los antibióticos: Durante muchos años se ha normalizado la prescripción de antibióticos en medicina humana y veterinaria frente a cualquier tipo de patología, pese a no conocer la etiología específica, como es el caso de procesos víricos, frente a los cuales son ineficaces, lo que conlleva una pérdida de eficacia y el desarrollo de resistencia a los antibióticos utilizados. (Viswanathan, 2014).
- Uso de antibióticos en ganadería y agricultura: A lo largo de los años, los antibióticos se han utilizado para mejorar el crecimiento y la salud de los animales indiscriminadamente, y en la agricultura para mejorar las cosechas, dando lugar a la aparición de bacterias resistentes. En 2006 se prohibió este tipo de uso de los antibióticos (Ventola, 2015).

La mayor demanda y necesidad de proteína de origen animal en los países en desarrollo, ha fomentado la agricultura intensiva, dando como resultado un mayor número de tratamientos con antimicrobianos y con ello la aparición de numerosas resistencias, que pueden aparecer como residuos en los productos de origen animal (Manyi-Loh et al., 2018). De este modo, el sistema de producción animal ha favorecido el desarrollo de resistencia a los antibióticos tanto usados como prevención de enfermedades o como promotores de crecimiento (prohibidos en la Unión Europea desde 2006 y en EE.UU. desde 2017), con consecuencias en salud pública (Nguyen et al., 2021; Kelland, 2019).

En 1976 se demostró por primera vez la transmisión de plásmidos portadores de genes de resistencia a partir de los pollos a las personas mediante el contacto con los animales y el ambiente de las granjas (Levi et al, 1976; citado por Marshall y Levy, 2011), si bien los estudios de los alimentos derivados de animales como fuente de AMR para las personas, se ha realizado posteriormente (Marshall y Levy, 2011).

La RAM originada en la producción animal también afectan a patógenos zoonóticos como algunas serovares de *Salmonella* o *Campylobacter spp.*, ambos asociados con enfermedades diarreicas, y a bacterias comensales en las personas y los animales, como *Escherichia coli* o *Enterococcus* (Witte, 1998). Las bacterias pueden transferir y propagar rápidamente la resistencia a otras especies bacterianas. Hoy en día, queda claro que la transmisión de la RAM es de ida y vuelta. Inicialmente, se culpó al uso veterinario de los antibióticos, pero hace tiempo que se demostró que la responsabilidad es similar, por el mal uso de los antibióticos en medicina humana y animal, y entre ambos se ha contaminado el medioambiente, de modo que todo el entorno global se encuentra contaminado con bacterias y elementos genéticos móviles de resistencia. (Berkner et al 2014).

Las consecuencias en Salud Pública son importantes ya que amenaza los logros terapéuticos, poniendo en peligro la vida de las personas y los animales. De hecho, la Organización Mundial de la Salud ha nombrado a la resistencia a los antibióticos como una de las tres amenazas más importantes para la salud pública del siglo XXI. (Frieri et al., 2017).

Por otro lado, el desarrollo de nuevos antibióticos es escaso; después de ocho décadas de uso de antibióticos, las infecciones bacterianas que alguna vez fueron fáciles de tratar se están volviendo intratables. Las áreas de especial preocupación son los microorganismos gram-negativos productores de carbapenemasas y la multi-resistencia, en particular, de patógenos importantes como la gonorrea y la tuberculosis multirresistente (MacGowan y Macnaughton, 2017).

La OMS (2017) ha establecido una clasificación de las bacterias con una prioridad crítica en relación a las resistencias que desarrollan. En primer lugar, en el grupo de las bacterias de prioridad crítica, se encuentra *Acinetobacter baumannii* (productor de carbapenemasas), seguido de *Pseudomona aeruginosa* (productor de carbapenemasas), Enterobacteriaceae (productor de carbapenemasas y resistentes a cefalosporinas de 3ª generación). En el grupo de las bacterias de alta prioridad se encuentran *Enterococcus faecium* (resistente a la vancomicina), *Helicobacter pylori* (resistente a la claritromicina), especies de *Salmonella spp.* (resistentes a fluoroquinolonas), *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina y vancomicina), especies de



*Campylobacter spp.* (resistentes a fluoroquinolonas) y *Neisseria gonorrhoeae* (resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y a fluoroquinolonas). Finalmente, el grupo de prioridad media, incluye *Streptococcus pneumoniae* (resistente a penicilina), *Haemophilus influenzae* (resistente a la ampicilina) y especies de *Shigella spp.* (resistentes a fluoroquinolonas) (OMS, 2017).

La globalización y la interconexión contribuyen a la aparición, evolución y propagación de microorganismos resistentes a los antibióticos a escala local y mundial. Como resultado del vínculo establecido entre la salud humana, animal y ambiental, la RAM se abordan a través del enfoque “Una Salud” y por ello, varios países están implantando planes de acción basados en él para combatir los microorganismos resistentes siguiendo las directrices de la Asociación Cuatриpartita (Bilal et al., 2021).

### 3.3. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteraceae*. Son bacilos Gram-negativos capaces de crecer en condiciones aerobias y anaerobias, preferiblemente a 37°C. Pueden ser inmóviles o móviles por flagelos peritricos (Bou et al, 2011). Posee una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos que incluyen el lípido A, los oligosacáridos centrales, y un polisacárido único, llamado antígeno O, responsable de la virulencia de la bacteria (Fratamico et al., 2016).

*Escherichia coli* está ampliamente distribuida, es el principal anaerobio facultativo que habita en el intestino grueso de las personas y los animales de sangre caliente y la bacteria comensal más frecuente del tracto gastrointestinal (Jang et al., 2017). Estudios recientes han informado que algunas cepas específicas de *E. coli* pueden sobrevivir largos períodos de tiempo y potencialmente reproducirse, en ambientes extra-intestinales, siendo capaz de integrarse en las comunidades microbianas autóctonas del medio ambiente (Jang et al, 2017).

Se conocen, al menos, 91 genes de factores de virulencia de *E. coli* y se distinguen 4 clases de virulencia en los patotipos de *E. coli*: colonización, adecuación al medio, toxinas y efectores. (Hartadi et al., 2020).

*Escherichia coli* es una de las causas más importantes de diarrea post-destete en cerdos. Esta diarrea es responsable de pérdidas económicas por mortalidad, morbilidad y disminución de la tasa de crecimiento. Recientemente, se ha observado en todo el mundo un aumento en la incidencia de brotes de diarrea grave asociada a *E. coli*. El desarrollo de múltiples resistencias bacterianas a una amplia gama de antibióticos de uso común y un aumento reciente en la prevalencia y gravedad de los síndromes post-destete requieren del uso de medidas alternativas para su control (Hartadi et al., 2020).

En un estudio llevado a cabo por Renzhammer y su equipo, se analizaron un total de 694 muestras clínicas de *E. coli* procedentes de poblaciones de cerdos europeas. Se estudió la susceptibilidad de los aislados a diferentes antibióticos utilizando la prueba de Kirby-Baüer. El 71,9% eran resistentes a ampicilina, un 67,7% a tetraciclina y un 49,5% a sulfametoxazol, mientras que la resistencia frente a la gentamicina y la fosfomicina fueron 7,7% y 2%, respectivamente. Además, demostraron que una cepa tiene más posibilidades de ser resistente a la ampicilina si previamente es resistente a la ciprofloxacina (Renzhammer et al., 2020).

En otro estudio similar (Burow et al., 2019), en *Escherichia coli* de muestras fecales de cerdos, del total de animales tratados, los betalactámicos, las tetraciclinas y la colistina fueron los más utilizados. La resistencia a ampicilina y tetraciclina en *E. coli* era frecuente antes del tratamiento con antibióticos y el porcentaje de resistencia era mayor en los cerdos tratados con betalactámicos, tetraciclinas, colistina y macrólidos, en comparación con cerdos no tratados. Se demostró que la resistencia a la azitromicina aumentaba tras tratar a los animales con ese antibiótico, y los animales que no habían sido tratados tenían aislados más susceptibles. Además, los lechones eran más propensos a portar un *E. coli* resistente a la ampicilina o la azitromicina si sus madres también lo portaban (Burow et al., 2019).

En otro estudio (De Jong et al., 2022), realizado entre 2004 y 2018, se evaluó la susceptibilidad a los antibióticos de importancia médica de 613 *E. coli* aislados de muestras intestinales de animales de producción mediante la prueba de Kirby-Baüer según las pautas del CLSI y EUCAST. No se detectó resistencia a meropenem y tigeciclina, del 0,2 al 2% a la azitromicina, del 1,1% al 5,4% a las cefalosporinas de 3ª generación, un 4% a la colistina, del 7% al 23% a la ciprofloxacina, un 7% a la gentamicina, y un 10% al cloranfenicol. La resistencia más elevada se detectó en la ampicilina (32-65%), la tetraciclina (41-67%), la trimetoprima (32-35%) y el trimetoprima/sulfametoxazol (28-50%), señalando la baja resistencia frente a los antibióticos de importancia clínica (meropenem y tigeciclina), mientras que a la ciprofloxacina era elevada.

Desde el punto de vista patógeno, *E. coli* se puede categorizar en base a criterios genéticos y clínicos en tres grupos principales: comensal, patógeno entérico o diarreico y patógeno extraintestinal (ExPEC). La gravedad de la enfermedad varía desde una gastroenteritis leve a una grave y potencialmente mortal. (Mirhoseini et al., 2018).

*E. coli* puede causar infección en casi todos los órganos. Sin embargo, el tracto urinario es el sitio extraintestinal más frecuente, causando cistitis. *E. coli* también puede causar neumonía e infecciones en ámbitos quirúrgicos como la meningitis neonatal o la septicemia (Liu et al., 2021).

Según su patogenicidad, las cepas de *E. coli* se clasifican en: *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enteroagregante (EAEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC). En general, se caracterizan por provocar diarrea en individuos jóvenes, lactantes o adultos, principalmente en países con bajos ingresos y con deficiencias higiénicas, junto al Síndrome Hemolítico Urémico en los casos más graves (Goldstein and Bentancor., 2022).

Una de las cepas patógenas más importante es el *E. coli* STEC **O157:H7**, que produce toxina Shiga. Es capaz de sobrevivir en el medio ambiente en gran variedad de condiciones. La morbilidad puede ser elevada, con importantes brotes en todo el mundo. Son más comunes en los países de menores ingresos y deficiencia higiénica (Gambushe et al., 2022). Los productos alimenticios de origen bovino y los productos frescos contaminados con desechos bovinos, son la fuente más común de brotes de esta infección. Las cepas de STEC son una preocupación mundial ya que son la principal causa de diarrea acuosa aguda en niños y la principal causa de la diarrea del viajero, que también puede evolucionar a colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Lim et al., 2010).

Los *E. coli* aislados de muestras clínicas humanas presentan resistencia a diversos antimicrobianos, y la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y la resistencia a las fluoroquinolonas son unas de las más importantes. Las **BLEEs** son enzimas que hidrolizan la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas con la excepción de las carbapenemasas, cefamicinas o combinaciones de  $\beta$ -lactámicos. La mayoría de las BLEEs pertenecen a la clase A de Ambler de  $\beta$ -lactamasas, y son inhibidos por los inhibidores de la  $\beta$ -lactamasa (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y avibactam) (EUCAST, 2017).

Las primeras cepas productoras de BLEEs se identificaron en 1983 y desde entonces se han observado en todo el mundo. Esta distribución es el resultado de la expansión a base de clones de los organismos productores y la transferencia horizontal de genes BLEEs en plásmidos. Estas se han observado principalmente en la familia *Enterobacteriaceae*, primero en ambientes hospitalarios, luego en residencias de ancianos, y posteriormente en pacientes ambulatorios, portadores sanos, animales enfermos y sanos o productos alimenticios (EUCAST, 2017).

Las bacterias productoras de BLEEs que se encuentran con mayor frecuencia son *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, todas las demás *Enterobacteriaceae* clínicamente relevantes también pueden producir BLEEs. Su producción se ha relacionado con la especie bacteriana, la localización geográfica, tipo de pacientes y de infección. En 2015, se demostró que

la tasa de aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a las cefalosporinas de 3ª generación, superaron el 25% o incluso el 50% en varios países europeos (EUCAST, 2017).

La gran mayoría de las BLEEs son enzimas adquiridas, a través de genes vehiculados en plásmidos. Las BLEEs se expresan en varios niveles y poseen diferencias en la actividad frente a  $\beta$ -lactámicos específicos (por ejemplo, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam). El nivel de expresión, las propiedades de una enzima, y la co-presencia de otros mecanismos de resistencia, dan como resultado la gran variedad de resistencia de diferentes fenotipos observados entre aislados BLEE positivos (EUCAST, 2017).

#### 4. Justificación y objetivos

En la actualidad, la RAM es uno de los grandes retos a la salud humana y animal, por sus graves consecuencias, y el conocimiento de la situación de las RAM en bacterias comensales de los animales, y en particular en el ganado porcino, resulta crítico para evaluar el papel que desempeñan en su diseminación global. Estas premisas han desembocado en el proyecto de vigilancia de la RAM en explotaciones de ganado porcino, y en particular, en la profundización del estudio de *Escherichia coli* y su resistencia a antibióticos, con una visión global, integrada en el concepto “Una Salud”, evaluando el riesgo que puede suponer para la Salud Pública, así como a los animales de abasto y el medioambiente.

El objetivo principal de este trabajo, pretende contribuir al conocimiento de la resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli*, en la especie porcina, como reservorio y vehículo de la transmisión de la resistencia a antibióticos ya sean los usados en las granjas porcinas como a los antibióticos usados en el ámbito hospitalario, que de forma directa o indirecta (contaminación del ambiente o alimentos derivados), podrían llegar a la especie humana.

Objetivos concretos:

1. Aislar e identificar la bacteria *Escherichia coli*, procedente de muestras digestivas y respiratorias de explotaciones de ganado porcino, incluyendo la búsqueda de *E. coli* O157:H7.
2. Caracterizar los patrones fenotípicos de resistencia a los antibióticos usados en las granjas y usados en el ámbito hospitalario de medicina humana.
3. Realizar un estudio estadístico de los resultados observados: patrones de resistencia, aislamiento de *E.coli* O157:H7 y producción de BLEEs.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Población en estudio y obtención de muestras

Las muestras digestivas (rectales y de heces) y respiratorias (nasales), de animales sanos y enfermos, jóvenes y adultos, proceden de 13 granjas diferentes. Se han recogido mediante hisopos estériles en medio de transporte Amies (Deltalab® Rf.: 300287, España), han sido proporcionadas por el veterinario encargado de la ADS de Ágreda (Soria) dentro del programa de vigilancia de resistencias a antibióticos de las cepas circulantes en las explotaciones de ganado porcino de la provincia de Soria. Las muestras fueron recogidas cada dos semanas, aproximadamente, a lo largo del curso académico 2021/2022. Todo el proceso de aislamiento e identificación se ha desarrollado en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas, del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

Se trata de granjas de reproductoras y granjas de cebo de lechones. El tamaño se ha establecido tras el cálculo de la media de animales total y se consideró granja grande aquella que presentaba, o bien más de 300 cerdas reproductoras, o bien más de 1000 lechones, y, pequeña, aquella con menos de 300 cerdas o menos de 1000 lechones.

### 5.2. Aislamiento e Identificación de *E. coli*

*Escherichia coli* se ha aislado en agar Sangre (Sheep blood agar base; Oxoid, Rf: CM0850), para detectar la presencia/ausencia de hemólisis, y en agar MacConkey (MacConkey agar, Oxoid, Rf: CM0007), donde no crecen bacterias Gram positivas; la presencia de lactosa en el medio, diferencia las bacterias Gram negativas que la fermentan o no (Bou et al., 2011). Se cultiva a 37°C durante 24 horas, en condiciones de aerobiosis.

Las pruebas bioquímicas de identificación de *E. coli* usadas, son el medio Agar-hierro-triple azúcar ("Triple Sugar Iron Agar o agar TSI, OXOID RF: CM0277), el medio Urea-Indol (medio líquido de Christensen), y el reactivo de Kovacs, y la prueba de la catalasa (Bou et al., 2011).

Si el aislado utilizaba la lactosa, la sacarosa, la glucosa y produce gas, no produce sulfídrico, es Urea-Indol (+), catalasa (+) y oxidasa (-), se consideró finalmente *E. coli* (Bou et al., 2011). Los aislados identificados se congelaban a -20°C para los estudios posteriores.

Se aislaron 58 *E. coli*. De ese total, los 13 primeros aislados se perdieron en el proceso, por lo que no se pudieron estudiar algunos antibióticos. En los 45 aislados restantes se analizaron todos los antibióticos seleccionados.

Los antibióticos elegidos fueron los que habitualmente se usan este tipo de granjas, ya que el trabajo formaba parte de un proyecto de monitorización de patrones de resistencia a los

antibióticos usados normalmente en las granjas. Además, se añadieron los antibióticos utilizados en medicina humana.

### 5.3. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos. Método de Difusión en disco (DD).

El estudio fenotípico de la resistencia o susceptibilidad a los antibióticos se ha realizado por el método de difusión en disco (de Kirby Baüer), siguiendo las recomendaciones de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) o el “Clinical & Laboratory Standards Institute” (CLSI) para la determinación de la susceptibilidad. Los materiales necesarios son: cultivo puro de un microorganismo, placa con medio de Müller-Hinton (OXOID RF: CM0337B), que permite el crecimiento de la mayoría de especies bacterianas, y discos de antibióticos comerciales. Siguiendo el procedimiento de Leclercq et al. 2013: una suspensión de microorganismos en una solución salina al 0,9% estéril se lleva a la densidad 0,5 McFarland. La siembra se realiza con hisopo estéril sobre la placa de agar Müller-Hinton. Mediante pinzas metálicas, flameadas en la llama, se depositan los discos impregnados de antibiótico en la placa y se deja incubar a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente, se mide el halo de inhibición del crecimiento de la bacteria. Los microorganismos se pueden clasificar como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) según los rangos de referencia que establece el EUCAST o el CLSI.

Los antibióticos usado en este estudio son: **AcN**: ácido nalidíxico (30ug); **AMC**: amoxicilina-clavulánico (30 ug); **AMP**: Ampicilina (10ug); **AMX**: Amoxicilina (10 ug); **AZI**: Azitromicina (15 ug); **AZT**: Aztreonam (30 ug); **CAZ**: Ceftazidima (30ug); **CT**: Colistina (10 ug); **CTX**: Cefotaxime (30 ug); **CIP**: Ciprofloxacina (5ug); **DOX**: Doxiciclina (30 ug); **ENR**: Enrofloxacin (5 ug); **ERI**: Eritromicina (15 ug); **FFC**: Florfenicol (30 ug); **GEN**: Gentamicina (10ug); **LIN**: Lincomicina (15 ug); **MRB**: Marbofloxacina (5 ug); **MER**: Meropenem (10 ug); **NEO**: Neomicina (30 ug); **PEN**: Penicilina (10 ug); **STR**: Estreptomicina (10ug); **SXT**: Trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75 ug); **TE**: Tetraciclina (30 ug); **TIG**: Tigeciclina (15 ug).

### 5.4. Detección de E. coli productor de BLEEs. Método del DD (EUCAST, CLSI).

El método descrito para detectar microorganismos productores de BLEE ha sido diseñado para enterobacterias y se fundamenta en la inhibición de estas enzimas por el ácido clavulánico. El proceso se basa en colocar un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro de una placa de agar Müller-Hinton a una distancia de 30 mm de discos de ceftazidima, cefotaxima y aztreonam. La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE.

### 5.5. Análisis de aislados de *E. coli* multirresistentes (MDR).

Las bacterias pueden expresar más de un mecanismo de resistencia antimicrobiana, dando lugar a fenotipos de resistencia a múltiples fármacos (“multi-drug resistance” o MDR), que incluye aquellas cepas que son resistentes a 3 o más clases de antibióticos (Magiorakos, et al, 2011).

### 5.6. Método serológico de detección de *E. coli* O157:H7: uso de agar MacConkey-sorbitol y método de aglutinación con Acs específicos.

Para la detección de *E.coli* O157:H7 se ha utilizado la prueba *E.coli* O157 Latex Test (Thermo Fisher Scientific; Rf: R30959501), siguiendo sus recomendaciones. Es en una prueba de aglutinación en tarjeta para detectar el antígeno del serogrupo O157 mediante anticuerpos específicos obtenidos en conejo. Un control positivo y negativo proporcionados por en el kit, permiten validar la prueba. Siguiendo las instrucciones del fabricante. Si se observa la aglutinación en un minuto, se trata de *E.coli* O157, en caso contrario no.

Previamente a este paso, se recomienda la utilización de Sorbitol Mac Conkey Agar para completar la prueba y como medio de cribado primario, ya que el *E.coli* O157 no fermenta el sorbitol, por lo tanto dará colonias incoloras en este medio. El resto de aislados de *E. coli* fermentan el sorbitol y darán colonias rosas.

### 5.7. Búsqueda bibliográfica.

Para realizar la búsqueda de artículos científicos se han utilizado diferentes páginas web como por ejemplo Google académico, PubMed, ScienceDirect, la página web de la Biblioteca unizar, por “alcorze”; página web oficial de la OMS y EUCAST, así como libros procedentes de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, como de Internet.

### 5.8. Resultados estadísticos.

Los datos recogidos se introdujeron en la base de datos de Microsoft EXCEL. Esta ha sido la base con la que se han analizado los datos mediante el programa estadístico Epiinfo (7.5.2.0, de acceso libre en la web oficial del CDC: Center for the Diseases control and prevention; USA). Se obtuvieron las frecuencias y porcentajes de cada factor y variable, así como el análisis de regresión logística univariable, con el 95% de Intervalo de Confianza, considerando como asociación estadísticamente significativa el valor  $\leq 0,05$ . En el caso de que una celda de la tabla de contingencia tuviera valores inferiores a “5”, la interpretación del análisis se ha realizado por el método de “Fisher exact test”. Con los resultados del análisis se han desarrollado las tablas y gráficas en la base de datos Excel.

## 6. Resultados y discusión

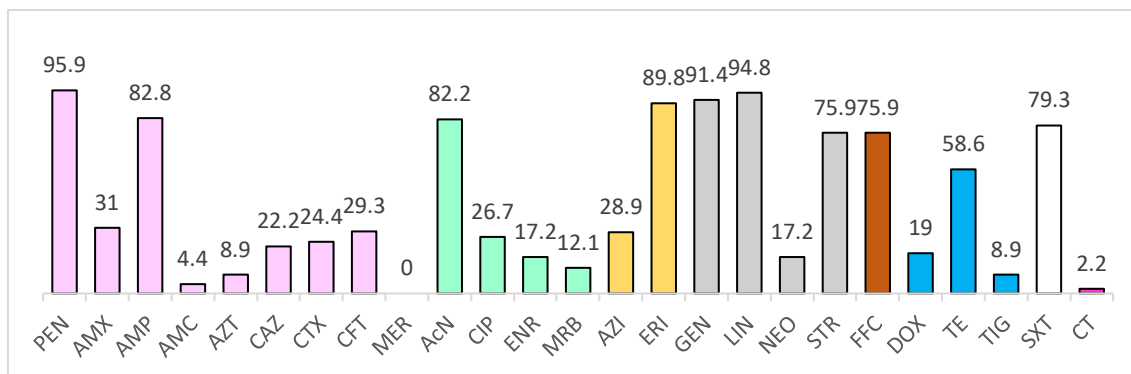
En el análisis de los resultados, el porcentaje de resistencia más elevadas se han encontrado para la **Penicilina, Lincomicina, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina, Ácido Nalidíxico, SxT** y la **Estreptomicina**, con valores superiores al 75% (Tabla 1 y gráfica 1). No todos los estudios revisados analizan los mismos antibióticos, sin embargo, lo primero que se puede deducir, es que son valores muy elevados. En el estudio desarrollado por Mencía-Ares et al (2021), los niveles de resistencia eran superiores en granjas intensivas (el 73% de los aislados eran resistentes al menos a un antibiótico), si bien los aislados procedían de heces, estiércol y del medioambiente, y la susceptibilidad a antibióticos se realizó por concentración mínima inhibitoria (CMI) en caldo. En ese estudio, la resistencia a la tetraciclina era un 65%, (59% en nuestro estudio) a la Ampicilina un 55% (82% en nuestro estudio), es decir, con valores invertidos a los observados en nuestro estudio. Hay que considerar que ese trabajo se realizó en 2017-2018 y se analizaban granjas intensivas, extensivas y ecológicas, y solo en animales del último mes de engorde. En cualquier caso, se asume que la mayoría de los *E. coli* aislados de granjas porcinas presentan resistencia a múltiples antibióticos (Maynard et al., 2003).

**Tabla 1:** Frecuencia de la resistencia observada en los *E. coli* aislados de ganado porcino frente a 26 antibióticos, junto a la proporción de aislados multiresistentes.

Frecuencias	% (n/N)	Frecuencias	% (n/N)
<b>Penicilina</b>	95,9 (47/49)	<b>Florfenicol</b>	25,9 (15/58)
<b>Lincomicina</b>	94,8 (55/58)	<b>Cefotaxima</b>	24,4 (11/45)
<b>Gentamicina</b>	91,4 (53/58)	<b>Ceftazidime</b>	22,2 (10/45)
<b>Eritromicina</b>	89,9 (44/49)	<b>Doxiciclina</b>	19 (11/58)
<b>Ampicilina</b>	82,8 (48/58)	<b>Enrofloxacina</b>	17,2 (10/58)
<b>Ac. Nalidíxico</b>	82,8 (37/45)	<b>Neomicina</b>	17,2 (10/58)
<b>Trim.-Sulfa.*</b>	79,3 (46/58)	<b>Marbofloxacina</b>	12,1 (7/58)
<b>Estreptomicina</b>	75,9 (44/58)	<b>Tigeciclina</b>	8,9 (4/45)
<b>Tetraciclina</b>	58,6 (34/58)	<b>Aztreonam</b>	8,9 (4/45)
<b>Amoxilina</b>	31,0 (18/58)	<b>Amox-clav**</b>	4,4 (2/45)
<b>Ceftiofur</b>	29,3 (17/58)	<b>Colistina</b>	2,2 (1/45)
<b>Azitromicina</b>	28,9 (13/45)	<b>Meropenem</b>	0 (0/45)
<b>Ciprofloxacina</b>	26,7 (12/45)	<b>Multiresistentes</b>	86,2 (50/58)

\*: trimetoprim-sulfametoxazol; \*\* Amoxicilina-Clavulánico



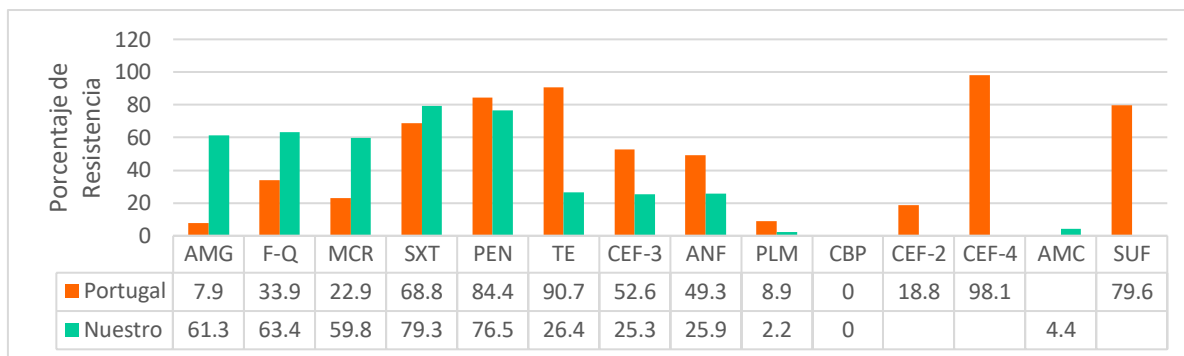


**AcN:** Ácido nalidíxico; **AMC:** Amoxicilina-clavulánico; **AMP:** Ampicilina; **AMX:** Amoxicilina; **AZT:** Aztreonam; **AZI:** Azitromicina; **CAZ:** Ceftazidime; **CFT:** Ceftiofur; **CIP:** Ciprofloxacina; **CT:** Colistina; **CTX:** Cefotaxima; **DOX:** Doxiciclina; **ENR:** Enrofloxacin; **ERI:** Eritromicina; **FFC:** Flofenicol; **GEN:** Gentamicina; **LIN:** Lincomicina; **MER:** Meropenem; **MRB:** Marbofloxacina; **NEO:** Neomicina; **PEN:** Penicilina; **STR:** Streptomicina; **TE:** Tetraciclina; **TIG:** Tigeciclina; **SXT:** Trimetoprim-sulfametoxazol.

**Gráfica 1:** Porcentaje de la resistencia observada en los antibióticos analizados, agrupados por clase de antibiótico.

Por otro lado, el **meropenem, colistina, amoxicilina-clavulánico, aztreonam, tigeciclina**, presentan valores muy bajos (desde 0 a 10%) de resistencia (tabla 1 y gráfica 1). En el estudio de Mecía et al (2021), todos los aislados de *E. coli* fueron susceptibles a meropenem, colistina y tigeciclina, mientras que, en nuestro estudio, a excepción del meropenem, (todos los aislados susceptibles), la resistencia a la colistina, Amoxicilina-clavulánico, aztreonam y tigeciclina dieron de 2,2% a 8,9%. La falta de estandarización de los estudios da lugar a esta variabilidad y la relación entre consumo de antibióticos y aparición de la resistencia no siempre se ha podido demostrar, aunque se asume, que existe. (Mecía et al 2021).

En Portugal (Costa et al, 2022) se realizó entre 2014 y 2018 un programa de vigilancia de las RAM con las recomendaciones de la Comisión Europea. Se hizo el seguimiento de bacterias de interés sanitario, entre ellas *E. coli*, tanto de granjas porcinas y otras especies. Hemos hecho una comparación entre los resultados obtenidos en Portugal y los encontrados en nuestro estudio. Para ello, hemos realizado la media de los antibióticos de cada clase utilizados en nuestro estudio, ya que en el estudio de Portugal se ha presentado la resistencia por clases de antibióticos. La comparación se observa en la gráfica 2.



**AMC:** Amoxicilina-clavulánico; **AMG:** Aminoglucósidos; **ANF:** Anfenicoles; **CBP:** Carbapenemes; **CEF (2ª-3ª-4ª):** Cefalosporinas de 2ª, 3ª y 4ª generación; **F-Q:** Fluoroquinolonas; **MCR:** Macrólidos; **PEN:** Penicilinas; **SUF:** Sulfamidas; **SXT:** Trimetoprim-sulfametoxazol; **TE:** Tetraciclinas

**Gráfica 2:** Comparación de porcentajes de resistencia frente a diferentes grupos de antibióticos entre los resultados del estudio de Portugal (Costa et al., 2022), y nuestro trabajo.

En la gráfica 2, se observa que la resistencia encontrada en Portugal y en nuestro estudio es diferente casi en cada clase de antibióticos, excepto para **SXT** y **PEN**, que muestran valores similares. Observamos que, en nuestro trabajo, la resistencia encontrada frente a **aminoglucósidos**, **fluoro-quinolonas** y **macrólidos**, es muy elevada comparada con los resultados de Portugal, mientras que, para **tetraciclinas**, **polimixinas**, **cefalosporinas de 3ª G** y **anfenicoles**, es muy superior en Portugal. Algunos de los grupos no fueron analizados en uno u otro de los estudios (cefalosporinas de 2ªG y 4ªG, amoxicilina-clavulánico y sulfamidas). En ambos trabajos, se observa la ausencia de resistencia frente a los carbapenemes. Las diferencias observadas podrían estar relacionadas con el diferente consumo de antibióticos. Según el Informe de JIACRA de 2017 (datos de 2014), España consumía casi el doble de antimicrobianos en mg/Kg de biomasa en animales, es decir 418,8 en España y 201,6 en Portugal, lo que no parece que se refleje en esos resultados.

En el informe del JIACRA de 2018, en **España**, se presentó el consumo de antibióticos en sanidad animal, calculado en PCU (siglas en inglés: Unidades corregidas de población), desde 2011 a 2016, en el conjunto de animales de abasto. Se observaba que desde 2012 el consumo fue aumentando progresivamente en los siguientes años hasta 2015 y 2016, con unos máximos de 7.500 toneladas, y al valorar las especies animales por separado, el ganado porcino tenía los valores más altos de todas las especies, llegando a valores superiores a 3.000 PCU. En el año 2016, el consumo del ganado porcino, respecto al que consumen el resto de las especies, de betalactámicos era de un 58,5%, el de fluoroquinolonas un 60%, polomixinas un 81%, tetraciclinas un 58%, macrólidos un 28% y cefalosporinas era un 41%. Se observa cómo, del 2015 al 2016 disminuyeron los consumos de colistina y neomicina casi a la mitad, mientras

aumentaban ligeramente otros (como la apramicina), y en 2017, la colistina se redujo casi a un quinto desde 2015 y la neomicina, a un tercio.

En relación a la **resistencia de *E. coli*** (JIACRA de 2018), el porcentaje anual de aislados resistentes de porcino era de 72,4% en el 2011, el 76,5% en 2013 y 82,4% en 2015, y, en nuestro estudio, el 100% de los aislados eran resistentes a, al menos, un antibiótico, lo que podría interpretarse como poca o nula reducción del consumo de antibióticos a lo largo de este tiempo en estas explotaciones. Para la **cefotaxima**, la resistencia era de un 0,6% en 2011, 2013 y 2015 en España, muy bajo comparado con el 24,4% encontrado en nuestro estudio (Tabla 1, media de 2021 y 2022). Para las **fluoroquinolonas**, los valores aumentaban con el tiempo desde 28,2% en 2011, 30% en 2013 y 45,3% en 2015, mientras que en la tabla y la Gráfica1, se observa que la media de resistencia a la **CIP, ENR y MRB**, son valores inferiores, quizás indicando una contención en el consumo de estos antimicrobianos en estas explotaciones, en los años 2021 y 2022.

Sin embargo, cuando se realizó la comparación de la resistencia a los antibióticos en los años **2021 y 2022** (Tabla 2 y Gráfica 3) se observaba que en el año **2021** se encontraron cifras significativamente superiores de resistencias frente a **ceftiofur, florfenicol y estreptomicina**. En este caso, se ha observado una disminución significativa en 2022. Según las recomendaciones de los organismos sanitarios internacionales (OMS, 2017 y EMA 2022), el **ceftiofur** es una cefalosporina de 3ªG que pertenece al grupo B, que solo debe usarse si fallan los antibióticos del D y el C. El **florfenicol** y la **estreptomicina** son del grupo C, que se pueden usar si fallan todos los del D. Esto podría indicar un éxito parcial de las recomendaciones.

Sin embargo, para la **amoxicilina**, el porcentaje de resistencia era significativamente superior en el **2022**. En este caso, podría estar haciendo efecto la normativa legal mencionada (EMA, 2020) ya que la Amoxicilina está en el grupo D, de uso prudente en animales de producción.

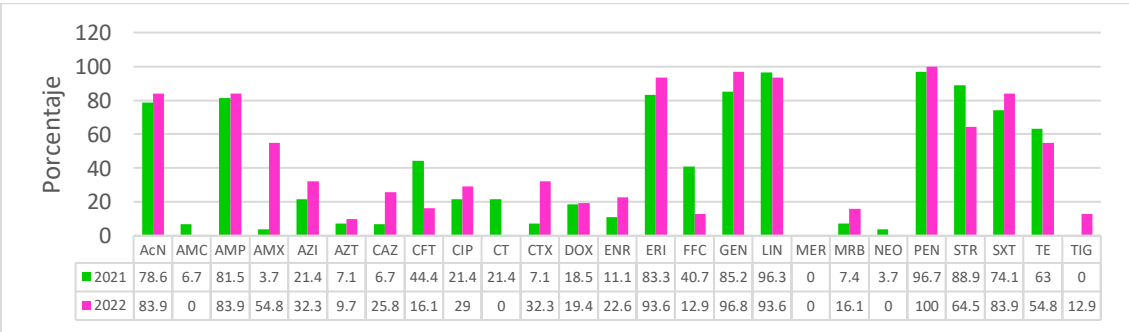
La **tendencia** observada (Gráfica 3), aunque no significativa, ha sido el **aumento de resistencias** en el año **2022** para **AcN, AMP, AZT, AZI, CAZ, CIP, CTX, ENR, ERI, GEN, MRB, PEN, SXT y TIG**. Con estos resultados, aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas, esta tendencia al aumento de la resistencia en 2022, es preocupante. Entre estos antibióticos están algunos de importancia sanitaria como las fluoroquinolonas (CIP, ENR, MRB), las cefalosporinas de 3ª G de uso humano (CAZ y CTX), entre otros y que parece indicar, que en las granjas analizadas todavía no se ha conseguido moderar el uso de algunos antibióticos. Por otro lado, para la **DOX** la resistencia era **similar** en ambos años y para **LIN, NEO y TE**, se observa una tendencia a la **disminución** en 2022. En relación con los aislados de *E. coli* **multiresistentes**, también mostraban un elevado porcentaje en los 2 años (tabla 2). La elevada resistencia detectada en las granjas estudiadas, no se puede atribuir, siempre al consumo, que como ya se

ha comentado anteriormente, no siempre hay una relación directa (Mecía et al 2021). No hay que olvidar que la transferencia de genes de resistencia podría ocurrir por medio de bacterias y genes de resistencia existentes en el ambiente. También se ha observado que los alimentos que contienen antibióticos pueden ingerirse en dosis subóptimas y favorecer el desarrollo de resistencia (EFSA, 2021)

**Tabla 2:** Tabla de frecuencias y porcentajes de resistencia a los antibióticos analizados en los aislados de *E. coli* en relación al año de muestreo.

Año (N)	2021 % (n/N)	2022 % (n/N)	Año (N)	2021 % (n/N)	2022 % (n/N)
<b>Ac. nalidíxico</b>	78,6 (11/14)	83,9 (26/31)	<b>Enrofloxacina</b>	11,1 (3/27)	22,6 (7/31)
<b>Amoxicilina*</b>	3,7 (1/27)	54,8 (17/31)	<b>Estreptomicina*</b>	88,9 (24/35)	64,5 (20/31)
<b>Amox-clav.#</b>	6,7 (2/14)	0 (0/31)	<b>Florfenicol*</b>	40,7 (11/27)	12,9 (4/31)
<b>Ampicilina</b>	81,5 (22/27)	83,9 (26/31)	<b>Gentamicina</b>	85,2 (23/27)	96,8 (30/31)
<b>Azitromicina</b>	21,4 (3/14)	32,3 (10/31)	<b>Lincomicina</b>	96,3 (26/35)	93,6 (29/31)
<b>Aztreonam</b>	7,1 (1/14)	9,7 (3/31)	<b>Marbofloxacina</b>	7,4 (2/35)	16,1 (5/31)
<b>Cefotaxime</b>	7,1 (1/14)	32,3 (10/31)	<b>Meropenem</b>	0 (0/14)	0 (0/31)
<b>Ceftazidime</b>	6,7 (2/14)	25,8 (8/31)	<b>Neomicina</b>	3,7 (1/35)	0 (0/31)
<b>Ceftiofur*</b>	44,4 (12/27)	16,1 (5/31)	<b>Penicilina</b>	100 (18/18)	93,7 (29/31)
<b>Ciprofoxacina</b>	21,4 (3/14)	29 (9/31)	<b>Tetraciclina</b>	63 (17/35)	54,8 (17/31)
<b>Colistina</b>	7,1 (1/14)	0 (0/31)	<b>Tigeciclina</b>	0 (0/35)	12,9 (4/23)
<b>Doxiciclina</b>	18,5 (5/27)	19,4 (6/31)	<b>Trim-sulfa. §</b>	74,1 (20/35)	83,9 )
<b>Eritromicina</b>	83,3 (15/18)	93,6 (29/31)	<b>Multiresistentes</b>	88,9 (24/27)	83,9 (26/31)

\*: Diferencias estadísticamente significativas; #: Amoxicilina-clavulánico §: timetoprim-sulfametoxazol



**AcN:** Ácido nalidíxico; **AMC:** Amoxicilina-clavulánico; **AMP:** Ampicilina; **AMX:** Amoxicilina; **AZT:** Aztreonam; **AZI:** Azitromicina; **CAZ:** Ceftazidime; **CFT:** Ceftiofur; **CIP:** Ciprofloxacina; **CT:** Colistina; **CTX:** Cefotaxima; **DOX:** Doxiciclina; **ENR:** Enrofloxacina; **ERI:** Eritromicina; **FFC:** Flofenicol; **GEN:** Gentamicina; **LIN:** Lincomicina; **MER:** Meropenem; **MRB:** Marbofloxacina; **NEO:** Neomicina; **PEN:** Penicilina; **STR:** Estreptomicina; **TE:** Tetraciclina; **TIG:** Tigeciclina; **SxT:** Trimetoprim-sulfametoxazol.

**Gráfica 3:** Comparación de la resistencia a los antibióticos utilizados en los *E. coli* aislados entre 2021 y 2022.

En el informe del JIACRA (2018), la resistencia a las polimixinas era de 0,6% en 2013, y pasó a un 2,9% en 2015, y en nuestro estudio hemos encontrado un 2,2 %, que podría indicar un estancamiento en su uso en estas granjas. La resistencia a la **colistina** es importante ya que se ha utilizado mucho en granjas porcinas. Las bacterias gram negativas en general, y en particular *E. coli*, han desarrollado resistencia a Beta-lactamasas de espectro extendido, pero también frente a los carbapenemes, y fluoroquinolonas, dejando pocas opciones para el tratamiento en los hospitales. Una de las alternativas es la polimixina E (colistina), y la detección de aislados resistentes a colistina en los animales de abasto, ha supuesto un problema de cara a la diseminación y transmisión de esa resistencia a los hospitales, donde podría darse la situación de no tener alternativa de tratamiento frente a esos aislados (Binsker et al, 2022).

Hoy en día se conoce bien que los genes de resistencia a este antibiótico pueden ser mediados por plásmidos (genes *mcr*) (Liu et al, 2016), que se transmiten rápidamente, independientemente de la presión selectiva. Junto a las de las fluoroquinolonas, son de transmisión fácil entre animales y personas (en ambas direcciones), ya que hay algunos *E. coli* (ST10 y ST744), que se encuentran en numerosas especies animales y portan y diseminan genes de resistencia a antimicrobianos de importancia crítica. La resistencia a fluoroquinolonas es igualmente un alto riesgo, y el *E. coli* ST131, frecuente en ganado porcino, porta genes de esta resistencia, y pueden portar genes de resistencia a cefalosporinas. Sin embargo, hay estudios (Zingali et al 2020), que dicen que no está claro que los animales intervengan en esta transmisión. Independientemente del origen, está claro que la resistencia a las fluoroquinolonas y a la colistina, pueden transmitirse junto a genes de resistencia a otros antibióticos (Cantón et al, 2011). En 42 países han informado de valores inferiores al 1%, de resistencia a Colistina; de los 27 europeos, se dan valores entre 1 y 6%, en países como Grecia, Reino Unido, España o Portugal. En el continente asiático, en Japón y Corea del Sur es menor del 1%, mientras que, en Vietnam, Tailandia, Camboya o China, oscila entre el 10 y el 23%. En África y América del sur hay pocos datos, y suelen dar valores inferiores al 1%. En nuestro estudio, la colistina muestra valores de prevalencia del 2,2% en 2021 y cero en 2022, que entraría en el rango de los países europeos (Shivdeep et al., 2022).

En Europa (Shivdeep et al., 2022), la prevalencia de resistencia de *E. coli* a **fluoroquinolonas** oscila del 1 al 5% en 17 países, y los valores más altos (9 al 14%) se informan en países como España, Portugal o Rumanía. Mientras que, en Asia, varía desde el 1% en Japón e Indonesia (cerdos sanos), hasta valores del 13-46% en India, Corea del Sur, Tailandia, Vietnam o China. En Canadá, EEUU, Australia y Nueva Zelanda, se dan valores inferiores al 1%, al igual que en África.

En nuestro estudio, se han obtenido un 26,7% de aislados resistentes a la ciprofloxacina, que es elevado y similar a los encontrados en países asiáticos.

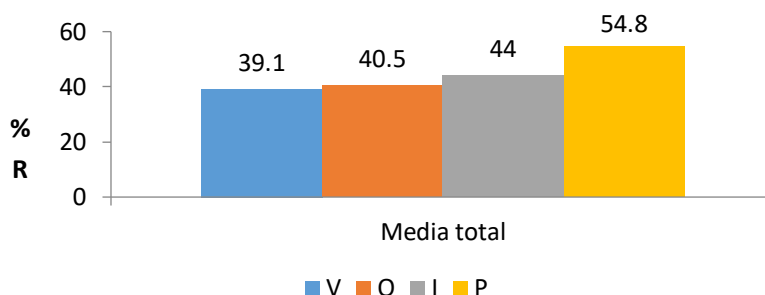
En el estudio llevado a cabo en Europa por De Jong et al. (2022), la resistencia a **Ácido Nalidíxico**, era baja (menor al 5%), pero aumentó en los periodos desde 2004-2006, 2013-2014, 2017-2018. En nuestro estudio, era muy elevada (82,2%) y aumenta del 2021 al 2022 (Tabla 2). En relación a **Cefotaxime**, los valores eran inferiores al 1%, con un ligero aumento hasta 2014, pero descendiendo en 2017-2018, mientras que en nuestro estudio era 7,1% en 2021 y muy superior en 2022 (32,3%). Para el **Cloranfenicol**, se encontraron valores entre el 13 al 21%, con un aumento notable en 2017-2018, mientras que, en nuestro estudio, el **Florfenicol** (no se ha analizado el CL), llegó a 40,7% en 2021, pero bajó drásticamente en 2022 (diferencia significativa). Para la **Getnamicina**, daban valores entre 2-3% desde 2004 a 2018, y en nuestro estudio se han detectado valores muy altos, con aumento en 2022 (85,2% en 2021 y 96,8%, en 2022). En relación a la **Tetraciclina**, la resistencia informada estaba en valores entre 50 y 66%, con una tendencia a disminuir desde 2013 a 2018, y en nuestro estudio ronda alrededor de esos valores, con ligero descenso desde 2021 (63%) a 2022 (54,8%). Finalmente, en la evaluación de la UE, la resistencia a **SXT** oscilaba entre un 25 y 40% con tendencia a disminuir desde los periodos de 2013-14 al de 2017-18. En nuestro estudio, la resistencia es muy elevada en 2021 (74,1%), y aumentaba en 2022 (83,9%). De nuevo, se observa que, al menos en las granjas analizadas, el problema de la resistencia a antibióticos, en general, es grave. Desde que se han instaurado las medidas de contención del uso de antibióticos, la mortalidad por la diarrea ha aumentado considerablemente. Los antibióticos, desde el punto de vista médico, son necesarios, sin embargo, parece que lo que está fallando es el manejo, y habrá que plantear nuevas formas de producción que controle la infección para no depender exclusivamente de su uso (Soundararajan et al, 2022).

También se evaluaron la resistencia a los antibióticos en relación con **la estación del año** en la que se realizó el muestreo. El total de aislados queda desigualmente distribuido a lo largo del tiempo, es decir, 7 aislados Invierno (I), 19 en Otoño (O), 5 en Primavera (P) y 26 en Verano (V). En consecuencia, el análisis de los resultados, con cuatro variables, no ha sido válido en la mayoría de las asociaciones. Para la **PEN, AMP y AcN**, la resistencia es **elevada** durante todo el año (>70% de resistencias en todas las estaciones). Respecto a **AMC** solo hubo aislados resistentes en **otoño** (1/10) y **verano** (1/23) y, para **AZT**, solo en **primavera** (3/5) y **verano** (1/23). Por esta razón, se realizaron agrupaciones de invierno y otoño (meses fríos) *versus* primavera y verano (meses cálidos), y cuando el número de aislados por celda lo permitía se realizó el análisis estadístico. Ninguna de las asociaciones de la estación y la resistencia, era significativa para **AcN**,

**AMX, AZI, CTX, CAZ, CFTI, CIP, DOX, ENR, STR, FFC SXT** y aislados **MDR**. Para el resto de antibióticos no había suficientes aislados para desarrollar el análisis estadístico.

Sin embargo, se detectó alguna tendencia, por ejemplo, en la primavera los valores habían sido más elevados que los obtenidos en el resto de las estaciones. Al realizar la media de la resistencia (Gráfica 6) obtenida de todos los antibióticos en cada estación, se observa una diferencia entre la obtenida en la primavera, respecto al resto, llevándose más de 10 puntos con el resto de las estaciones.

En el estudio de Costa y col. (2022), presentaron valores generales de la resistencia de *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* aislados de varias especies animales (incluido porcino), y observaban que era prácticamente igual en cada estación, sin diferencias reseñables. Sus resultados no son equiparables ya que trabajaron con aislados de ganado porcino de engorde, de gallinas ponedoras, de pavos de engorde y muestras de carne de pollo y de cerdo, de los cuales consiguieron un total de 2.423 *E. coli*, y en nuestro estudio han sido 58 aislados, solo de porcino de engorde. Con estos resultados no es posible concluir que la estación sea un factor que influya en la resistencia a antimicrobianos.



**Gráfica 6:** Media del porcentaje de la resistencia de *E. coli* a los antibióticos analizados en cada estación del año.

Del total de 45 aislados de *E. coli* en los que se pudo hacer la **detección de BLEEs**, por método fenotípico (EUCAST), 16 fueron BLEEs (35,6%). La prevalencia de *E. coli* productores de BLEEs en cerdos de engorde y en carne de cerdos, es variable en los diferentes países europeos. La media global de la prevalencia de BLEEs en Europa, en *E. coli* aislados de cerdos de engorde, ascendió de 1,4% en 2012 a un 30,2% en 2015. En ese año España informó de un 81,5% (Bergspika et al, 2020). En 2017, la media global era de un 30,6% y en España, seguía siendo elevada (80,3%). Es destacable que, España informa de baja venta de cefalosporinas en animales de abasto, pero contrasta con la prevalencia de *E. coli* portadores de BLEEs en esos años.

Nuestro trabajo realizado en 2020 y 2021, aunque no tenemos los datos de ventas y prevalencia de estos años, sí que se puede observar que en las granjas estudiadas es muy inferior a la informada en los años 2015 y 2017, si bien en nuestro estudio, los animales analizados pertenecían a diferentes edades. En un reciente estudio, (Martínez-Álvarez et al., 2023), se analizaron las muestras nasales de 40 lechones de 4 granjas porcinas en Aragón, y en paralelo, se muestreó a los trabajadores de las granjas (n= 10). En los *E. coli* aislados, se estudió el fenotipo de resistencia a una batería de antibióticos (por la prueba de difusión en disco), así como la detección de portadores de BLEES, se complementó con el posterior estudio genético. Nueve del total (n=28) eran portadores de BLEEs (32,1%). La mayoría de los 28 aislados, eran MDR (81,8%), mayoritariamente con fenotipo AMP-CL-TE-SXT. (Martínez-Álvarez et al., 2023). Los valores de *E. coli*-portadores de BLEEs, encontrados en nuestro trabajo (Tabla 3) son ligeramente superiores (35,6%), si bien, se ha trabajado con muestras respiratorias y digestivas. Una posibilidad es, que la presencia de *E. coli*, en las fosas nasales, pudiera ser por contaminación a través del contacto con las heces, localización habitual de *E. coli*, si bien esto solo puede ser demostrado si los aislados en fosas nasales y de las heces, fueran genotipados.

El análisis de posibles asociaciones entre los aislados de *E. coli* portadores de BLEEs, y los antibióticos analizados (Tabla 3) **no** ha sido válido por escasez de datos en relación al **AZT, MRB y NEO** (alta susceptibilidad en portadores y no-portadores de BLEEs), **ERI, GEN, LIN y PEN** (alta Resistencia en ambos).

Tampoco es válido el análisis estadístico al contrastarlo con los aislados **MDR** (alta proporción de MDR en ambos grupos), sin embargo, se han observado diferencias significativas en los aislados portadores de BLEEs en relación con **CAZ y CTX**, en los que la proporción de aislados resistentes es ampliamente superior en los *E. coli* portadores de **BLEEs** respecto a los que no los portan. Esto es esperable ya que es, precisamente el uso de cefalosporinas de 3<sup>a</sup>G, lo que puede favorecer el desarrollo de BLEEs (Bergšpica et al, 2020).

Con respecto a la **Streptomycin**, no se muestra una diferencia significativa, (Tabla 3) pero se acerca a la significancia (tabla 3), mostrando una **alta resistencia** en los aislados portadores de **BLEEs**, en relación a los que no los portan. La resistencia a los aminoglucósidos puede ser transmitida en plásmidos que a su vez pueden portar genes de resistencia a otros antibióticos, como a las cefalosporinas (Cantón et al., 2011).



**Tabla 3:** porcentaje de resistencia de los aislados de *E. coli* portadores de BLEEs y los *E. coli* que no los portan, en relación con los antibióticos estudiados

Antibiótico	BLEE	No-BLEE	Antibiótico	BLEE	No-BLEE
<b>Ac. Nalidíxico</b>	87,5 (14/16)	79,3 (23/29)	<b>Estreptomicina</b>	87,5 (14/16)	62,1 (18/29)
<b>Amoxicilina</b>	50 (8/16)	34,5 (10/29)	<b>Eritromicina</b>	97,8 (15/16)	86,2 (25/29)
<b>Amox-clav. #</b>	0 (0/16)	6,9 (2/29)	<b>Florfenicol</b>	12,5 (2/16)	20,7 (6/29)
<b>Ampicilina</b>	93,8 (15/16)	79,3 (23/29)	<b>Gentamicina</b>	93,8 (15/16)	93,1 (27/29)
<b>Azitromicina</b>	25 (4/16)	31 (9/29)	<b>Lincomicina</b>	93,8 (15/16)	96,6 (28/29)
<b>Aztreonam</b>	6,3 (1/16)	10,3 (3/29)	<b>Marbofloxacin</b>	12,5 (/2/16)	13,8 (4/29)
<b>Cefotaxime*</b>	62,5 (10/16)	3,5 (1/29)	<b>Meropenem</b>	0 (0/16)	0 (0/16)
<b>Ceftazidime*</b>	50 (8/16)	6,9 (2/29)	<b>Neomicina</b>	25 (4/16)	10,3 (3/29)
<b>Ceftiofur</b>	25 (4/16)	41,4 (12/29)	<b>Penicilina</b>	93,8 (15/16)	96,6 28/29)
<b>Ciprofloxacina</b>	31,3 (5716)	24,1 (7/29)	<b>Tetraciclina</b>	56,3 (9/16)	58,6 (17/29)
<b>Colistina</b>	0 (0/16)	3,4 (1/29)	<b>Tigeciclina</b>	18,8 (3/16)	3,5 (1/29)
<b>Doxiciclina</b>	18,8 (3/16)	20,7 (6/29)	<b>Trim-sulfa. §</b>	93,8 (15/16)	82,8 (24/29)
<b>Enrofloxacin</b>	25 (4/16)	17,2 (5/29)			

\*: Diferencias estadísticamente significativas; #: Amoxicilina-clavulánico §: timetoprim-sulfametoxazol

Por otro lado, el valor de aislados de **MDR**, encontrado en nuestro estudio, es alto (86,2%, Tabla 1). En el estudio de Mencia et al (2021), detectaron un 52,7%, muy por debajo del nuestro. En el estudio de la EFSA de 2022 (De Jong et al, 2022), en el periodo 2004 a 2018, dan una prevalencia de aislados MDR en la UE del 24%, en ganado porcino (basado en 10 clases de antimicrobianos), además, se observaba una tendencia a descender con el tiempo. Observaban 24 diferentes fenotipos, en los que el más prevalente eran AMP/TE/SXT (12%), y AMP/CL/TE (7%). En total, un 1,6% eran resistentes a 5 clases de antibióticos, y el 0,5% a 6 clases. En 6 aislados la resistencia era a 7 tipos de antibióticos. Al analizar la combinación de resistencia a CIP y CTX en ganado porcino o era nulo o muy bajo.

En nuestro trabajo se ha encontrado multi-resistencia de 3 a 8 clases de antibióticos. La asociación más frecuente era GEN-AMP-SXT (63%; 33/52). La de AMP-TE-SXT, más prevalente (12%) en el estudio de De Jong y col., (2022), en nuestro estudio es del 42% (22/52), y la de AMP-CL-TE, que encontraban en un 7%, en nuestro estudio es un 17% (9/52). Esto confirma que la resistencia a los antibióticos es muy variable en las diferentes regiones geográficas.

En el informe del JIACRA de 2018 en España, el porcentaje de *E. coli* multiresistentes estaba por encima del 50%, pero por debajo del encontrado en nuestro estudio (86,2%, Tabla 1). El informe detectó gran variabilidad de combinaciones de la resistencia en los aislados MDR, pero los más

destacados en *E. coli* de origen porcino, entre 2011-2013 era de AMG (aminoglucósidos), SUL (Sulfamidas) y TE (Tetraciclinas), incluyendo otros grupos como los BLEEs, anfenicoles y quinolonas, que no coincide con lo encontrado en las granjas de nuestro estudio. El informe del JIACRA sugiere que hay correlación entre consumo de antibióticos y porcentaje de resistencia. Son valores muy bajos, la correlación consumo-resistencia en animales era de  $R^2 = 0,3244$  (débil), la de las personas era  $R^2 = 0,0673$  (nula), y la de consumo en animales-resistencia en aislados humanos era  $R^2 = 0,1759$  (muy débil). En nuestra opinión, afirmar relación con estos valores es temerario, máxime si quieren desviar la atención hacia el consumo en animales o disculpar el uso en humanos. Otros autores desdican estas relaciones (Mecía et al 2021)

El consumo de antibióticos en España se ha reducido de 418,8 mg/PCU (2014) a 172,4 mg/PCU en 2018 (un 48%), cerca de la media europea, situada en 107 mg/PCU en ese año. Los grupos más consumidos, hasta 2018, fueron las Penicilinas, Tetraciclinas y Aminoglucósidos (PRAN, 2020). A su vez, se ha reducido un 53,2% la venta general de antibióticos para la producción animal desde el 2011 hasta el 2021 (de 335 mg/PCU a 157,2 mg/PCU). Se ha reducido un 98,8% la venta de polimixinas, un 36,1% de quinolonas, un 63,8% de fluoroquinolonas y ha aumentado un 24% de cefalosporinas de 3ª y 4ª generación. En el caso de las granjas de este estudio, parece observarse la reducción de *E. Coli* resistentes a colistina y el aumento de la resistencia a cefalosporinas de 3ª y 4ª G (tabla 2).

Se ha estudiado el nivel de resistencia de los aislados de *E. coli*, según el origen de la muestra de **Digestivo (D) vs Respiratorio (R)**, (tabla 4). En algunos antibióticos estudiados, el análisis estadístico no era válido debido al bajo número de aislados en algunas variables. Así ocurre para la **AMC**, que de los aislados respiratorios no hay ninguno resistente y la **TIG** que de los 30 aislados del digestivo, ninguno era resistente. Estos resultados podían esperarse ya que son antibióticos más propios de uso humano. En el caso de **AZI, CTX, CAZ, CIP, ENR, NEO y SxT**, se observan valores altos de aislados susceptibles (Tabla 4) en ambos tipos de muestras. Mientras que la resistencia a **ERI, GEN, LIN y PEN** (Tabla 4), era elevada, rondando el 90-95% de aislados resistentes, independientemente del tipo de muestra. Los resultados parecen indicar que los aislados de muestras respiratorias, pudieran ser consecuencia de la adquisición de *E. coli* fecal, por contacto del hocico con heces. En el caso de la **AMP y STR**, que rondan el 80%, y la **TE**, entre 50-60% en ambas muestras, la diferencia **no** es significativa.

Se ha detectado diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), en la resistencia a la **DOX**, (Tabla 4), la resistencia de aislados de muestras digestivas es un 28,6% (10/35), muy superior a los aislados del respiratorio (4,35%; 1/23); y el **FFC**, con un porcentaje de aislados resistentes de muestras

digestivas del 5,71% (2/35), notablemente inferior a los aislados del respiratorio (56%, 13/23). Estos resultados indican que hay aislados de *E. coli* de las heces y respiratorios que pueden tener diferentes orígenes. La doxiciclina es muy recomendada para procesos respiratorios y, sin embargo, la resistencia más elevada se ha observado en los aislados del digestivo, mientras que el florfenicol puede recomendarse en procesos digestivos, respiratorios, sistémicos, etc. En su conjunto, la mayor resistencia se ha observado en los aislados del respiratorio (la media es un 42%) y en aislados del digestivo es un 38,3%, pero las diferencias no son significativas.

Los valores de los *E. coli* **MDR** son elevados (>85%), independientemente de su procedencia (muestras digestivas o respiratorias). No hemos encontrado estudios similares con los que contrastar estos resultados.

**Tabla 4:** porcentaje y frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a los antibióticos analizados en el estudio en relación con el origen de muestra (Digestivo o Respiratorio).

	Digestivo %	Respiratorio		Digestivo %	Respiratorio
Antibiótico	(n/N)	% (n/N)	Antibiótico	(n/N)	% (n/N)
<b>Ac. Nalidíxico</b>	80,0 (24/30)	86,7 (13/15)	<b>Eritromicina</b>	90,0 (27/30)	89,5 (17/19)
<b>Amoxicilina</b>	40,0 (14/35)	17,4 (4/23)	<b>Estreptomicina</b>	74,3 (26/35)	78,3 (18/23)
<b>Amox- clav.#</b>	6,7 (2/30)	0 (0/15)	<b>Florfenicol*</b>	5,7 (2/35)	56,5 (13/23)
<b>Ampicilina</b>	85,7 (30/35)	78,3 (18/23)	<b>Gentamicina</b>	88,6 (31/35)	95,7 (22/23)
<b>Azitromicina</b>	6,7 (2/30)	13,3 (2/15)	<b>Lincomicina</b>	94,3 (33/35)	95,7 (22/23)
<b>Aztreonam</b>	30,0 (9/30)	26,7 (4/15)	<b>Marbofloxacin</b>	8,6 (3/35)	17,4 (4/23)
<b>Cefotaxime</b>	26,7 (8/30)	20,0 (3/15)	<b>Meropenem</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Ceftazidime</b>	23,3 (7/30)	20,0 (3/15)	<b>Neomicina</b>	11,4 (4/35)	26,1 (6/23)
<b>Ceftiofur</b>	28,6 (10/35)	30,4 (7/23)	<b>Penicilina</b>	96,7 (29/30)	94,7 (18/19)
<b>Ciprofloxacina</b>	23,3 (7/30)	33,3 (5/15)	<b>Tetraciclina</b>	57,1 (20/35)	60,9 (14/23)
<b>Colistina</b>	0 (0/30)	6,7 (1/15)	<b>Tigeciclina</b>	0 (0)	26,7 (4/15)
<b>Doxiciclina*</b>	28,6 (10/35)	4,4 (1/23)	<b>Trim-sulfa.§</b>	71,4 (22/35)	91,3 (21/23)
<b>Enrofloxacin</b>	14,4 (5/35)	21,7 (5/23)	<b>MDR</b>	85,7 (30/35)	87 (20/23)

\*: Diferencias estadísticamente significativas; #: Amoxicilina-clavulánico; §: timetoprim-sulfametoxazol

En relación con el **tamaño de las granjas**, se han detectado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en la proporción de aislados resistentes para **CFT**, **ENR**, **FFC**, **MRB**, **NEO** y **STR**, y en todas ellas, las granjas pequeñas tenían valores superiores de resistencia respecto a las grandes. También en las granjas pequeñas se detectaron valores de resistencia superiores para **AcN**, **AMP**, **AZT**, **CIP**, **CTX**, **SXT** y **TE**, si bien las diferencias no eran significativas o el análisis no era válido. Por otro lado, en las granjas de >300 cerdas, se observa una proporción más alta de resistencia

frente a **AZI** y **DOX**. Para **AMX**, **LIN** y **PEN** los niveles de resistencia fueron similares en ambos tipos de granjas. La resistencia a **AMC**, solo se observó en granjas grandes y en baja proporción. El análisis no fue válido para **AMP**, **CT**, **ERI**, **GEN**, **LIN**, **PEN** y **TIG**. Con respecto a los aislados **MDR** (diferencias NS), la proporción más elevada se observó en las granjas pequeñas. Estos resultados plantean la posibilidad de que en las granjas más pequeñas existan factores que influyan en la necesidad de utilizar antibióticos con más frecuencia que en las de número más elevado. Los antibióticos para los que la diferencia ha sido significativa, son, en su mayoría, de uso no recomendado, con alguna excepción.

**Tabla 5:** Porcentaje y frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes según el tamaño de la granja.

Nº Cerdas	Pequeñas (n/N)	%	Grandes (n/N)	%	Nº Cerdas	Pequeñas (n/N)	%	Grandes (n/N)	%
<b>Ac. Nalidíxico</b>	100 (10/10)		77,1 (27/35)		<b>Eritromicina</b>	78,6 (11/14)		94,3 (33/35)	
<b>Amoxicilina</b>	31,3 (5/16)		21,4 (9/42)		<b>Estreptomicina*</b>	93,8 (15/16)		69,1 (29/42)	
<b>Amox-clav. #</b>	0 (0/10)		5,7 (2/35)		<b>Florfenicol*</b>	50 (8/16)		16,7 (7/42)	
<b>Ampicilina</b>	87,5 (14/16)		81 (34/42)		<b>Gentamicina</b>	87,5 (14/16)		92,9 (39/42)	
<b>Azitromicina</b>	10 (1/10)		34,3 (12/35)		<b>Lincomicina</b>	93,8 (15/16)		95,2 (40/42)	
<b>Aztreonam</b>	30 (3/10)		2,9 (1/35)		<b>Marbofloxacin*</b>	31,3 (5/16)		4,8 (2/42)	
<b>Cefotaxima</b>	30 (3/10)		22,9 (8/35)		<b>Meropenem</b>	0 (0/10)		0 (0/35)	
<b>Ceftazidime</b>	20 (2/10)		22,9 (8/35)		<b>Neomicina*</b>	43,8 (7/16)		9,5 (4/42)	
<b>Ceftiofur*</b>	50 (8/16)		21,4 (9/42)		<b>Penicilina</b>	92,9 (13/14)		97,1 (34/35)	
<b>Ciprofloxacina</b>	50 (5/10)		20 (7/35)		<b>Tetraciclina</b>	81,3 (13/16)		50 (21/42)	
<b>Colistina</b>	0 (0/10)		5,7 (1/35)		<b>Tigeciclina</b>	30 (3/14)		2,9 (1/35)	
<b>Doxiciclina</b>	12,5 (2/16)		21,4 (9/42)		<b>Trim-sulfa. §</b>	87,5 (14/16)		76,2 (32/42)	
<b>Enrofloxacin*</b>	37,5 (6/16)		9,5 (4/42)		<b>MDR</b>	93,8 (15/16)		83,3 (35/42)	

\*: Diferencias estadísticamente significativas; #: Amoxicilina-clavulánico §: timetoprim-sulfametoxazol

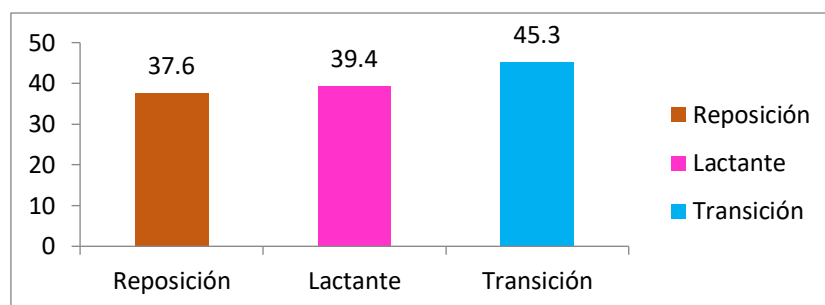
Para las granjas pequeñas, los que más resistencia han dado, aunque no hayan sido diferencias significativas, son del grupo D (EMA 2020): **AMP**, **SXT** y la **TE** independientemente de que, la mayoría de los antibióticos tienen importancia en medicina humana, como las fluoroquinolonas, las cefalosporinas de 3ªG, los anfenicoles, aminoglucósidos y los macrólidos. Todo esto se refleja (diferencia NS) en la MDR de los aislados de las granjas pequeñas. Existen estudios en relación con la prevalencia de RAM en diarrea post-destete, en la que *E. coli* es el agente principal, pero no se han encontrado en relación con el tamaño de granja. En ellos, se observa que, a mayor tamaño de la granja, mayor número de casos, lo que supondría mayor uso de antibióticos y potencialmente mayor resistencia, pero en nuestro estudio se ve lo contrario. Por otro lado, se

admite que hay contradicciones en los diferentes estudios de diarreas del destete y el tamaño de la granja (Rhouma et al., 2017). Recientemente Mallioris et al. (2022) encontraron asociación negativa, es decir, se consumen menos antibióticos, cuanto mayor es el número de animales de la granja, lo que podría relacionarse con lo observado en nuestro estudio, si se admite la relación entre el consumo y el desarrollo de la AMR, que, como ya se ha explicado, no queda establecido.

La **edad de los animales** estudiados se dividió en tres etapas: **Lactante (L)**, hasta el primer mes de vida, **Transición (T)**, del primer mes hasta 3 meses de edad y **Reposición (R)**, los animales mayores de 3 meses que, o bien se van a matadero, o se quedan como reposición. Los niveles de **resistencia** de los aislados (Tabla 6) muestran una distribución entre las diferentes etapas bastante parecida, si bien se pueden observar valores más elevados en la **transición** en relación con **AcN**, **AMP**, **AMX**, **CAZ**, **CIP**, **ENR**, **FFC**, **MRB**, **STR**, **SXT** y **TIG**, pero la diferencia no es significativa ( $p > 0,05$ ). Por el contrario, el grupo de aislados de transición **no** mostraba **resistencia** a **AMC**, así como los lactantes, no mostraban resistencia a **CTX**. Además, la proporción de aislados **MDR** (Tabla 6), es muy elevada en los tres grupos de edad (superior al 80%) y el máximo se observó en el grupo de transición (93,8%). Esto podría estar relacionado con el hecho de que la etapa de lactantes, están bajo la protección materna, ya que ingieren calostro y leche. La diarrea por *E. coli* también puede ocurrir en los lactantes, sobre todo las primeras 24-48h, ya que son dependientes del calostro, pero la diarrea post-destete, es más frecuente y puede provocar muerte repentina o diarrea con deshidratación, así como retraso del crecimiento. Anteriormente, se trataba con colistina, pero hoy en día, este antibiótico es de importancia crítica en humanos contra infecciones por Gram negativos multi-resistentes. Se está controlando estrictamente su uso en los animales y solo se permite como un último recurso (Bilal et al, 2021). Nuestros resultados, pueden indicar que se está respetando en gran medida esta prohibición, ya que **solo se ha registrado un aislado** resistente, (Tabla 6), que se observó en un cerdo de transición, del año 2021, y se aisló de muestra respiratoria, es decir, que es posible que fuera portado en fosas nasales, a través del contacto con las heces, de su propia madre o del entorno (Rhouma et al, 2017). Esto podría explicar la elevada prevalencia de resistencia observada en la transición (Gráfica 7), ya sea por las condiciones de producción de las granjas analizadas, la transición podría necesitar más uso de antibióticos (Rhouma et al, 2017), lo que indicaría posible relación entre consumo y resistencia.

La resistencia a **AZI** (Tabla 6), es superior en los aislados de los lactantes, y, además, se observa el único aislado resistente a **NEO**, ya que, en el resto de los antibióticos, se ha mantenido en niveles de resistencia similares a los de la transición o la reposición. La azitromicina es un macrólido de uso humano, empleada en procesos respiratorios de microorganismos como

*Mycoplasma pneumoniae*, y, en los animales de producción, es del grupo C, y se utiliza cuando fallan los antibióticos del grupo D. Por ello, una explicación podría ser que se esté utilizando otro macrólido (eritromicina, con máxima resistencia en lactantes) para el tratamiento de infecciones respiratorias. La **resistencia** a eritromicina suele ser cruzada con otros **macrólidos** como la azitromicina. (Choi et al., 2021).



**Gráfica 7:** representación de la media de resistencia a todos los antibióticos analizados, por grupos de edad.

Se han estudiado las asociaciones de grupos de edad, siempre que el número de aislados era suficiente para hacerlo (Tabla 7). Las asociaciones fueron L vs R, L vs T y (L+T) vs R. Para la **AMP**, la asociación **(L + T) vs R**, se observa una **resistencia** más elevada en el grupo **(L + T) (80%)**, respecto a la reposición (60%), con valor cercano a la significancia ( $F=0,0585$ ). La AMP es un antibiótico de amplio uso del grupo D, y estos resultados indicarían que es más utilizado en las dos primeras etapas de la vida de los lechones, que es cuando más expuestos están a infecciones respiratorias y digestivas y más porcentaje de resistencias aparecen (Vinodhkumar et al., 2019).

Para la **AZI**, la asociación L vs R:  $F=0,0507$ , muestra una **resistencia** superior lactantes **(47,4%)**, respecto a la Reposición (10%). Podría estar relacionado con los procesos respiratorios en la fase de Lactancia tratados con macrólidos ante la ineficacia de los antibióticos del grupo D, o bien adquieren estos *E. coli* resistentes, de su madre y el entorno (Rhouma et al, 2017).

**Tabla 6:** Porcentaje y frecuencia de la resistencia a antibióticos de los *E. coli* aislados, en relación con los grupos de edad

Edades	Lechones % (n/N)	Transición % (n/N)	Reposición % (n/N)
<b>Ac. Nalidíxico</b> (AcN)	79 (15/19)	87,5 (14/16)	80 (8/10)
<b>Amoxicilina</b> (AMX)	25 (8/32)	43,8 (7/16)	30 (3/10)
<b>Amoxicilina-clavulánico</b> (AMC)	5,3 (1/19)	0 (0/16)	10 (1/10)
<b>Ampicilina</b> (AMP)	84,4 (27/32)	93,8 (15/16)	60 (6/10)
<b>Azitromicina</b> (AZI)	47,4 (9/19)	18,8 (3/16)	10 (1/10)
<b>Aztreonam</b> (AZT)	5,3 (1/19)	12,5 (2/16)	10 (1/10)
<b>Cefotaxima</b> (CTX)	31,6 (6/19)	31,3 (5/16)	0 (0/10)
<b>Ceftazidime</b> (CAZ)	21,1 (4/19)	31,3 (5/16)	10 (1/10)
<b>Ceftiofur</b> (CFT)	9,4 (3/32)	50 (8/16)	60 (6/10)
<b>Ciprofloxacina</b> (CIP)	26,3 (5/19)	31,3 (5/16)	20 (2/10)
<b>Colistina</b> (CT)	0 (0/19)	6,3 (1/16)	0 (0/10)
<b>Doxiciclina</b> (DOX)	21,9 (7/32)	6,3 (1/16)	30 (3/10)
<b>Enrofloxacin</b> (ENR)	9,4 (3/32)	37,5 (6/16)	10 (1/10)
<b>Eritromicina</b> (ERI)	95,7 (22/23)	81,3 (13/16)	90 (9/10)
<b>Estreptomicina</b> (STR)	71,9 (23/32)	87,5 (14/16)	70 (7/10)
<b>Florfenicol</b> (FFC)	25 (8/32)	37,5 (6/16)	10 (1/10)
<b>Gentamicina</b> (GEN)	93,8 (30/32)	87,5 (14/16)	90 (9/10)
<b>Lincomicina</b> (LIN)	93,8 (30/32)	94,8 (15/16)	100 (10/10)
<b>Marbofloxacina</b> (MRB)	6,3 (2/32)	10 (1/10)	25 (4/16)
<b>Neomicina</b> (NEO)	3,1 (1/32)	0 (0/16)	0 (0/10)
<b>Penicilina</b> (PEN)	95,7 (22/23)	93,8 (15/16)	100 (10/10)
<b>Tetraciclina</b> (TE)	56,3 (18/32)	62,5 (10/16)	80 (6/10)
<b>Tigeciclina</b> (TIG)	5,3 (1/32)	18,8 (3/16)	0 (0/10)
<b>Trimetoprim-sulfamet.</b> (SXT)	71,9 (23/32)	93,8 (15/16)	80 (8/10)
<b>Multiresistentes</b> (MDR)	84,4 (27/32)	93,8 (15/16)	80 (8/10)

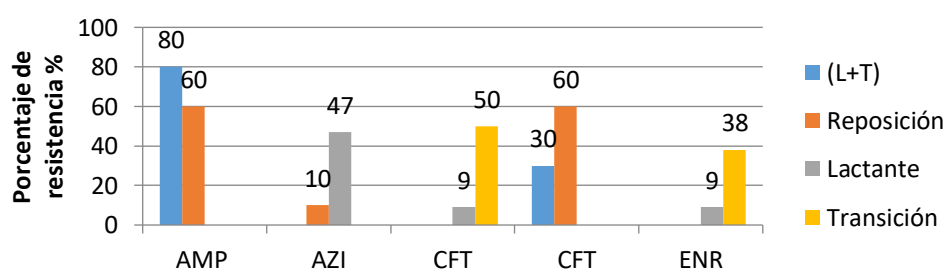
Para **CFT**, la asociación de la resistencia de los **L vs T** es significativa ( $F=0,0031$ ); en el grupo de la Transición era un **50% de resistencia**, mientras que el grupo de **Lactantes** era un **9,4%**, (Tabla 7) que, como se ha comentado, parece indicar un mayor uso de antibióticos respecto a los lactantes. También la asociación de **(L + T) vs R** era significativa ( $F=0,0284$ ), con una alta **resistencia** (60%) en el grupo de **Reposición**. El **CFT** es una cefalosporina de 3ª G, que se debe

utilizar en ausencia de antibióticos eficaces de los grupos D y C, y podría relacionarse con mayor uso de éste antibiótico en la etapa de Reposición, coincidiendo con mayor probabilidad sufrir infecciones (entre 4 y 9 meses de edad). El problema es que se pueden desarrollar *E. coli* portadores de BLEEs, lo que puede, no solo impide el tratamiento en la propia granja, sino que también podrían llegar a los alimentos derivados y a la especie humana (Vinodhkumar et al., 2019). Además, hay que señalar que, en las penicilinas, cefalosporinas y monobactam analizadas en este estudio, hemos encontrado resistencia en los tres grupos de edad, lo que, de nuevo, corrobora, el alto riesgo de desarrollar *E. coli* portadores de BLEEs, en estas granjas.

Para **ENR**, la asociación **L vs T** ( $F=0,0273$ ), (Tabla 7), se detecta marcadamente **superior** en el grupo de **T (37,5%)**, respecto al de **L (9,4%)**. De nuevo, apunta a un mayor uso de fluoroquinolonas en la Transición y esto es importante ya que la resistencia puede transmitirse en plásmidos, que, a su vez, pueden portar los genes de resistencia a cefalosporinas, con el riesgo de acceder a la cadena alimentaria y a la especie humana (Cantón et al., 2011)

**Tabla 7:** valores de resistencia de los grupos de edad que han mostrado asociación significativa con algunos antibióticos

Edades	Lactante % (n/N)	Transición % (n/N)	Reposición % (n/N)	L + T % (n/N)
<b>Ampicilina</b>	/	/	60 (6/10)	87,5 (42/48)
<b>Azitromicina</b>	47,4 (9/19)	/	10 (1/10)	/
<b>Ceftiofur</b>	9,4 (3/32)	50 (8/16)	60 (6/10)	22,9 (11/48)
<b>Enrofloxacin</b>	9,4 (3/32)	37,5 (6/16)	/	/



**Gráfica 8:** asociaciones de grupos de edad con diferencias significativas o próxima a la significancia en la resistencia a varios antibióticos.

En relación a las **granjas de las que se han recogido las muestras**, el bajo número de animales muestreados dificulta el análisis estadístico. Seleccionando los antibióticos con mayor porcentaje de resistencias, solo se han podido analizar las granjas S3 (n=16), S6 (n=7) y S12 (n=7),



y solamente se han observado **diferencias significativas** (test de Fisher  $\leq 0,005$ ) en la resistencia a **Ac. Nalidíxico**. Las granjas **S6 y S12**, tenían una alta proporción de aislados susceptibles ( $n=6$ ; 85,7% cada una) que contrasta con la observada en la granja S3 ( $n=11$ ; 68,6%). Los datos analizados indican que puede haber diferencias en el uso de antibióticos por granja. Como se informa en otros estudios, dependen del manejo, factores intrínsecos a los animales o alimentación, que puedan favorecer la aparición de diferentes infecciones a lo largo del proceso de producción (Rhouma et al, 2017).

En relación con los ***E.coli* O157:H7**, la identificación se basó, en primer lugar, en el cultivo en agar Mac Conkey-Sorbitol. **Ninguna** de las cepas aisladas resultó ser compatible con **O157:H7** (todas dieron color rosa). La eficacia de este método se ha confirmado en diferentes estudios, que le dan una sensibilidad del 100% y especificidad del 85%. De todos modos, se han encontrado algunas cepas que se aíslan de alimentos que contienen sorbitol, que mutan y producen un fenotipo fermentador, por lo que, si la sospecha es elevada, también se deberían elegir algunas colonias coloreadas, que se confirmarán con la prueba de aglutinación al látex (Usera, 2015).

Como método de confirmación e identificación de *E.coli* O157:H7 se realizó el test de aglutinación y todas las cepas analizadas resultaron **negativas** a esta cepa (no dieron aglutinación). El *E. coli* O157:H7 es productor de Shigatoxina (o toxinas vero; causa del síndrome hemolítico urémico humano, SUH). Hay otros serotipos de *E. coli* que también producen verotoxinas, pero normalmente, no se asocian a diarrea hemorrágica. Por otro lado, la presencia de *E. coli* verotoxigénicos como productor de toxiinfección alimentaria, parece estar aumentando. Brotes de colitis hemorrágica por consumo de alimentos contaminados se han descrito en todo el mundo y probablemente es una de las principales causas de diarrea hemorrágica a nivel mundial. En España la incidencia es menor que otros países (Usera, 2015).

El cultivo en Agar MacConkey-sorbitol y la agutinación al latex son métodos complementarios y sencillos para detectar este serotipo. La prueba de aglutinación detecta tanto el serotipo O157 como el H7. La sensibilidad y especificidad de la prueba se considera de casi el 100% (CDC, 2009)

## 7. Mejoras y propuestas para el futuro

La prevalencia de resistencia general, encontrada en las granjas estudiadas, es muy elevada y es preocupante encontrar resistencias frente a antibióticos de uso humano. Se ha podido observar el esfuerzo de ganaderos y veterinarios por dejar de utilizar antibióticos que pueden comprometer a la Salud Humana, pero el sector agropecuario debe seguir en el proceso de reevaluación de los sistemas productivos (ya se realiza un control estricto del uso de

antibióticos) con el objetivo de reducir el uso de estos fármacos. Unido a disminuir la prevalencia a enfermedades.

Algunas de las medidas que se están realizando y se podrían implantar con el tiempo para favorecer un sistema de producción eficiente serían: reducir la densidad de animales, mejor condición de las instalaciones, buen manejo, correcta limpieza y desinfección, uso de un programa vacunal apropiado a cada explotación, realizar pruebas con productos de fitoterapia o similares, potenciadores de la inmunidad, correcta aplicación de la normativa relativa al uso de antibióticos e ir poco a poco, a lo largo del tiempo, dando otro enfoque al sistema productivo. Es necesario mencionar que el uso de antibióticos no es viable eliminarlo ya que sin ellos la Sociedad no tendría alimento suficiente y de calidad para alimentarse, pero sí que es necesario controlar y evaluar su uso.

## 8. Conclusiones

1. En las granjas estudiadas se ha observado el aumento de la resistencia a numerosos antibióticos, lo que indica que las medidas de contención de su uso y la implementación de medidas relacionadas con el manejo y las instalaciones, deben ser revisadas y renovadas.
2. En las granjas de menos de 300 madres, es probable que haya factores, no determinados en este estudio, que causan un aumento del uso de antibióticos y podría desencadenar un aumento de los niveles de resistencia. Las etapas de edad analizadas, están indicando que el periodo de transición tiene que cambiar especialmente.
3. La nula y baja resistencia al meropenem, colistina y azitromicina, en las granjas estudiadas, indica que la profesión veterinaria y ganadera están haciendo un gran esfuerzo para reducir la Resistencia antimicrobiana y contribuir a la mejora de la Salud Humana.
4. A lo largo de la discusión se deduce que la relación entre consumo de antibióticos y resistencia no está claramente establecida y se debe seguir investigando, teniendo en mente que el medioambiente está contaminado con bacterias y elementos genéticos móviles de resistencia.
5. Finalmente, es evidente, teniendo en cuenta las limitaciones de este pequeño estudio, que el sector ganadero tiene que seguir adaptando la producción a un sistema más equilibrado, en el que el bienestar animal y la producción encuentren un término medio que beneficie a la salud animal y la salud humana.

## 9. Conclusions

1. Increased resistance to numerous antibiotics has been observed on the farms studied, indicating that measures to contain their use and implement measures related to management and farm facilities need to be reviewed and renewed.
2. In farms with less than 300 sows, it is likely that there are factors, not determined in this study, that cause an increase in antibiotic use and could trigger an increase in resistance levels. The age stages analysed are indicating that the transition period has to change especially.
3. The null and low resistance to meropenem, colistin and azithromycin in the farms studied indicates that the veterinary and farming profession is making a great effort to reduce antimicrobial resistance and contribute to the improvement of human health.
4. Throughout the discussion it is clear that the relationship between antibiotic consumption and resistance is not clearly established and further research is needed, keeping in mind that the environment is contaminated with bacteria and mobile genetic elements of resistance.
5. Finally, it is clear, taking into account the limitations of this small study, that the livestock sector has to continue to adapt production to a more balanced system, where animal welfare and production find a middle ground that benefits animal and human health.

## 10. Valoración personal

El presente trabajo de fin de grado ha sido muy enriquecedor para mí en todos los sentidos, no solo por el aprendizaje que conlleva realizar un trabajo experimental de laboratorio, si no por todo lo que implica en cuanto a condiciones personales como el esfuerzo, paciencia, comunicación y muchas otras que se adquieren durante el proceso. Estoy muy agradecido por la oportunidad ya que me ha servido para adentrarme en el mundo de la investigación y conocer de primera mano la metodología de trabajo, la organización que se necesita o la preparación concienzuda de cada detalle. En general, las valoraciones son muy positivas, ya que haciendo una vision global, el esfuerzo realizado ha valido la pena y espero haber aportado un granito de arena en el complejo mundo de las resistencias a los antibióticos, y, como dijo Neil Amstrong: “Esto es un pequeño paso para el hombre, pero un gran paso para la humanidad”.

## 11. Bibliografía

- Bennett, J.E., Dolin, R. y Blaser, M.J. (2015). "Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases". *Elsevier Health Sciences*. Vol 1. 8th ed. Philadelphia PA. DOI: 10.1016/C2012-1-00075-6
- Bergspica, I. et al. (2020). "Extended Spectrum beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union". *Antibiotics-basel*, 9(10), p. 678. DOI: 10.3390/antibiotics9100678.
- Berkner, S., Konradi, S. y Scöfneld, J. (2014). "Antibiotic resistance and the environment-there and back again". *EMBO Reports*, 15(7), pp. 740-744. DOI: 10.15252/embr.201438978.
- Bilal, A. et al. (2021). "Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. DOI: 10.3389/fcimb.2021.771510.
- Binsker, U., Kasbohrer, A. y Hammerl, J.A. (2022). "Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis". *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), p. 1j. DOI: 10.1093/femsre/fuab049.
- Bou, G. et al. (2011). "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), pp. 601–608. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.03.012.
- Burow, E. et al. (2019). "Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment". *Preventive Veterinary Medicine*, 165, pp. 52–62. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.008.
- Cantón, R. y Ruiz-Garbajosa, P. (2011). "Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes". *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), pp. 477–485. DOI: 10.1016/j.coph.2011.07.007.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2009). "Recommendatons for Diagnosis of Shiga Toxin Producing *E. coli* Infections by Clinical Laboratories". *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*. 58: 1-14.
- Choi, J.-H. et al. (2021). "Antimicrobial resistance profiles and macrolide resistance mechanisms of *Campylobacter coli* isolated from pigs and chickens". *Microorganisms*, 9(5). DOI: 10.3390/microorganisms9051077.
- Costa, M., Cardo, M., Cara d'Anjo, M., y Leite, A. (2022). "Assessing antimicrobial resistance occurrence in the Portuguese food system: Poultry, pigs and derived food, 2014–2018". *Zoonoses & Public Health*, 69(4), pp. 312–324. DOI: 10.1111/zph.12920.

D'Costa, V.M. *et al.* (2011). "Antibiotic resistance is ancient". *Nature*, 477(7365), pp. 457. DOI: 10.1038/nature10388.

De Jong, A. *et al.* (2022). "European-wide antimicrobial resistance monitoring in commensal *Escherichia coli* isolated from healthy food animals between 2004 and 2018". *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 77(12), pp. 3301-3311. DOI: 10.1093/jac/dkac318.

European Food Safety Authority (EFSA) (2021). "Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 12: Tetracyclines: tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, and doxycycline". *Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion*. EFSA Journal. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6864

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2017). "EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and epidemiological importance". *EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 1.0*.

European Medicines Agency (EMA). (2020). "Categorisation of antibiotics in the European Union". *European Medicines Agency, Science Medicines Health*.

Fratamico Pina, M. *et al.* (2016). "Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*". *Frontiers in Microbiology*, 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00644.

Frieri, M. *et al.* (2017). "Antibiotic resistance". *Journal of Infection and Public Health*. Volume 10, Issue 4. ISSN 1876-0341. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.

Gambushe, S.M., Zishiri, O.T. y El Zowalaty, M.E. (2022). "Review of *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence, Pathogenicity, Heavy Metal and Antimicrobial Resistance, African Perspective". *Infection and Drug Resistance*, 15, p. 4645. DOI: 10.2147/IDR.S365269.

Goldstein, J. y Bentancor, L. (2022). "Editorial: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections and consequences". *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, p. 1015653. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1015653.

Gullberg, E. *et al.* (2011). "Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations". *PLoS Pathogens*, 7(7), p. e1002158. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002158.

Hartadi, E.B. *et al.* (2020). "A Review of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Piglets: Public Health Importance". *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(9), pp. 687–698.

Jang, J. *et al.* (2017). "Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review". *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), p. 570. DOI: 10.1111/jam.13468.

Jevons, MP (1961). "Celbenin - resistant *Staphylococci*". *PubMed. Br Med J.* Jan 14;1(5219):124–5. PMID: PMC1952888.

JACRA (2018). "Primer análisis integrado del consume de antibióticos y su relación con la aparición de Resistencia". *Informe JACRA España*. Plan Nacional Resistencia Antibióticos.

Kelland, K. (2019). "Industria ganadera sigue usando antibióticos para estimular crecimiento de animales: OIE". *Reuters*. Disponible en: <https://www.reuters.com/article/salud-animales-antibioticos-idLTAKCN1Q3200> [Consultado 14-03-2023].

Khardori, N. (2006). "Antibiotics - Past, Present and Future". *ScienceDirect. ELSEVIER. Medical Clinics of North America*. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025712506000642?via%3Dihub> [Consultado 05-05-2023].

Leclercq, R. et al. (2013). "EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing". *Clinical Microbiology and Infection*, 19(2), pp. 141–160. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.

Lim, J.Y., Yoon, J. y Hovde, C.J. (2010). "A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157". *Journal of microbiology and biotechnology*. 20(1), pp. 5–14. Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=sso&db=cmedm&AN=20134227&lang=es&site=eds-live&scope=site> [Consultado 10-04-2023].

Liu, Y.-Y. et al. (2016). "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study". *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), pp. 161–168. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Liu, Y. et al. (2021). "*Escherichia coli* Causing Neonatal Meningitis During 2001-2020: A Study in Eastern China". *International journal of general medicine*. Jun 29;14:3007–16. DOI: 10.2147/IJGM.S317299

MacGowan, A. y Macnaughton, E. (2017). "Antibiotic resistance". *Medicine*. Volume 45, Issue 10. ISSN 1357-3039. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.07.006.

Magiorakos, A.P. et al. (2012). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance". *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Mallioris, P., Dohmen, W., Luiken, R.E.C., Wagenaar, J.A., Stegeman, A. y Mughini-Gras, L. (2022). "Factors associated with antimicrobial use in pig and veal calf farms in the Netherlands: A multi-method longitudinal data analysis". *Preventive Veterinary Medicine*. 2022;199. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105563

Manyi-Loh, C. et al. (2018). "Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications". *Molecules*, 23(4), p. 795. DOI: 10.3390/molecules23040795.

Marshall, B. y Levy, S. (2011). "Food animals and antimicrobials: impact on human health". *PubMed*. DOI: 10.1128/CMR.00002-11.

Martínez-Álvarez, S. et al (2023). "ESBL-producing *Escherichia coli* in nasal samples of livestock at farm level in Aragón, Spain". Comunicación a Congreso: *33rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*. (15-18 marzo de 2023).

Maynard, C. et al. (2003). "Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), pp. 3214–3221. DOI: 10.1128/AAC.47.10.3214-3221.2003.

Mencia-Ares, H. et al. (2021). "Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. is Influenced by Production System, Antimicrobial Use, and Biosecurity Measures on Spanish Pig Farms". *Porcine Health Management* 7 (1): 1–12. DOI: 10.1186/s40813-021-00206-

Mirhoseini, A., Amani, J. y Nazarian, S. (2018). "Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it". *Microbial Pathogenesis*, 117, pp. 162–169. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.032.

Munita, J.M. y Arias, C.A. (2016). "Mechanisms of Antibiotic Resistance". *Microbiol Spectr.* Apr;4(2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec. PMID: 27227291; PMCID: PMC4888801.

Nguyen, K. et al. (2021). "Antibiotic usage and resistance in animal production in Vietnam: a review of existing literature". *PubMed*. DOI: 10.1007/s11250-021-02780-6.

OMS, FAO y OIE (2021). "La resistencia a los antimicrobianos y el marco de cooperación de las naciones unidas para el desarrollo sostenible". *Orientación para los equipos de las Naciones Unidas en los países*.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017). "Categorisation of antibiotic used in animals promotes responsible use to protect public and animal health". *European Medicines Agency, Committee for Veterinary Medicinal Products, Committee for Medicinal Products for Human Use*.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2022). "La asociación cuatripartita lanza una plataforma de colaboración entre múltiples partes sobre la resistencia a los antimicrobianos

para hacer frente a la amenaza común para la salud de las personas y los animales, así como para los ecosistemas”. *Comunicado de prensa, Organización Mundial de la Salud*.

Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) (2020). “Informe anual 2019-2020”. *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)*.

Renzhammer, R. et al. (2020). “Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistances in *E. coli* Associated with Neonatal Diarrhea, Postweaning Diarrhea, and Edema Disease in Pigs from Austria”. *Antibiotics*, 9(208), p. 208. DOI: 10.3390/antibiotics9040208.

Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., y Letellier, A. (2017). “Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies”. *ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA*, 59, 31. DOI: 10.1186/s13028-017-0299-7

Shivdeep Singh, H. et al. (2022). “Global Distribution of Fluoroquinolone and Colistin Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin – A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Frontiers in Microbiology*, 13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.834793.

Soundararajan, M., et al. (2022). “Farming Practice Influences Antimicrobial Resistance Burden of Non-aureus *Staphylococci* in Pig Husbandries”. *Microorganisms*, 11(1), 31. DOI: 10.3390/microorganisms11010031

Uddin, T.M. et al. (2021). “Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects”. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), pp. 1750–1766. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.10.020.

Usera, M.A. (2015). “*Escherichia coli* O157 productor de verotoxina: un resumen práctico”. *Control de Calidad de la SEIMC*. Instituto de Salud Carlos III. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/o157.pdf> [Consultado 20-04-2023].

Ventola, C. (2015). “The Antibiotic Resistance Crisis”. *PubMed*. PMCID: PMC4378521. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/> [Consultado 03-05-2023].

VinodhKumar, O.R. et al. (2019). “Risk factor analysis, antimicrobial resistance and pathotyping of *Escherichia coli* associated with pre- and post-weaning piglet diarrhoea in organised farms, India”. *Epidemiology and Infection*, 147. DOI: 10.1017/S0950268819000591

Viswanathan, V.K. (2014). “Off-label abuse of antibiotics by bacteria”. *Gut Microbes*, 5(1), pp. 3-4–4. DOI: 10.4161/gmic.28027.



Witte, W. (1998). "Medical consequences of antibiotic use in agricultura". *Science*, vol. 279, no 5353, p. 996-997.

Zingali, T. et al. (2020). "Whole genome sequencing analysis of porcine faecal commensal *Escherichia coli* carrying class 1 integrons from sows and their offspring". *Microorganisms*, 8(6). DOI: 10.3390/microorganisms8060843.