



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

El trabajo aquí presentado es el trabajo de fin de grado del grado de Veterinaria de la Universidad de Veterinaria. Se realizó entre el 1 de octubre del 2018 y 21 de noviembre del 2019 en la unidad de Microbiología del Departamento de Patología Animal (Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (España)). Fue supervisado por los profesores Raúl C. Mainar Jaime y Jesús A. Arenas Busto.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El desarrollo y consumo de antibióticos	5
1.1.1 Los antibióticos β -lactámicos y su mecanismo de actuación	6
1.1.1.1 Cefalosporinas	8
1.1.1.2 Inhibidores de β -lactamasas	8
1.1.2 Clasificación de los antibióticos según su importancia crítica	9
1.2. El desarrollo de resistencias a antibióticos	10
1.2.1 Resistencias a los antibióticos en el sector porcino	12
1.2.2 Mecanismos y transmisión de resistencias frente a antibióticos β -lactámicos	13
1.2.3 Clasificación de las β -lactamasas	14
1.2.4 La lucha contra la resistencia antimicrobiana.....	16
1.3. El agente zoonótico <i>Salmonella</i> : un patógeno multi-resistente	17
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	19
3. METODOLOGÍA	20
3.1. Aislados de <i>Salmonella</i> utilizados	20
3.2. Detección fenotípica de cepas productoras de BLEE y AmpC	20
3.3. Análisis estadístico	21
3.4. Electroforesis en campo pulsado	21
3.5. Caracterización genética de las cepas productoras de BLEE y AmpC	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Prevalencia de cepas de <i>Salmonella</i> productoras de BLEE y AmpC.....	23
4.2. Caracterización genética de las cepas productoras de BLEE y AmpC	25
5. DISCUSIÓN	26
6. CONCLUSIONES.....	29
6. CONCLUSIONS.....	29
7. VALORACIÓN PERSONAL	29
8. BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN

Los antibióticos se han utilizado ampliamente durante las últimas décadas para el tratamiento de infecciones humanas y en animales, sobre todo, los β -lactámicos, tetraciclinas y macrólidos. Su uso ha ido acompañado de la aparición de bacterias resistentes a los mismos, reduciendo así el número de tratamientos disponibles contra las infecciones. El sector porcino ha sido el más afectado por el uso abusivo de antibióticos. En este contexto, el objetivo de este estudio ha sido valorar la prevalencia de la producción de β -lactamasas frente a cefalosporinas de tercera generación en dos paneles de 270 y 59 cepas de *Salmonella* aisladas en granjas de porcino de Aragón en dos periodos de tiempo separados por 10 años (2008-2009 y 2018, respectivamente). Los resultados mostraron una mayor prevalencia en las resistencias a las cefalosporinas en 2018 (3,64%, n=2) respecto a la mostrada por las cepas aisladas en el periodo 2008-2009 (0,37%, n=1). El análisis de las cepas resistentes mostró la producción de distintas β -lactamasas entre los dos periodos, β -lactamasas tipo AmpC y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) fueron encontradas en las cepas aisladas en el 2008-2009 y en el 2018, respectivamente. Las cepas resistentes del periodo 2008-2009 pertenecieron al serotipo *S. Bredeney* y estudios genéticos atribuyeron la producción de AmpC al gen *bla_{CMY-2}*, el cual está asociado con la resistencia frente a cefalosporinas y ha sido encontrado frecuentemente en enterobacterias. Las cepas resistentes del estudio del 2018 pertenecieron a *S. Typhimurium* y *S. Rissen*. Para la cepa *S. Rissen* se detectaron diferentes genes de resistencia, siendo el gen *bla_{TEM-1b}*, el más probable de causar la producción de BLEEs. En conclusión, el presente estudio muestra un incremento en el desarrollo de resistencias contra los antibióticos β -lactámicos.

ABSTRACT

Antibiotics have been widely used for the last decades for the treatment of human and animal infections, especially β -lactams, tetracyclines and macrolides. Antibiotic consumption has been related to the development of antibiotic-resistant bacteria, therefore limiting available treatments to fight bacterial infections. The porcine sector has been the most affected due to the high consumption of antibiotics. In this context, the aim of this work was to analyse the prevalence of β -lactamases production against the third generation of cephalosporines in two panels of 270 and 59 *Salmonella* strains isolated from pigs in farms located in Aragón at two periods of time (2008-2009 and 2018, respectively). The prevalence in cephalosporine resistance was higher in 2018 (3,64%, n=2) than in 2008-2009 (0,37%, n=1). Genetic analysis showed that the production of different β -lactamases in both pool of strains, β -lactamases AmpC type and extended spectrum β -lactamases (ESBL) were identified in isolates collected in 2008-2009 and 2018, respectively. The strain isolated of the period 2008-2009 belong to serotype *S. Bredeney*

and was encoded for a *bla*_{CMY-2} gene, which is harboured on plasmids and often isolated from enterobacteria. The two resistant strains recovered in 2018 were serotyped as monophasic variant of *S. Typhimurium* and *S. Rissen*, respectively. There were identified different antibiotic resistance genes in *S. Rissen* strain, including *bla*_{TEM-1b} gene, which encoded for an ESBL β -lactamase type. In conclusion, this study suggests an increase in the development of resistances to β -lactams.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El desarrollo y consumo de antibióticos

Los antibióticos son moléculas de distinta naturaleza que inhiben o inactivan los microbios actuando específicamente sobre la biogénesis de ciertas estructuras bacterianas o procesos metabólicos. El descubrimiento de la penicilina (1928) fue un punto relevante de la historia de la humanidad y uno de los eventos relacionados con la salud más importantes del último siglo. Desde entonces los antibióticos han sido ampliamente utilizados para tratar infecciones bacterianas, tanto en humanos como en animales. Como ejemplo de su utilización, en el año 2008 se vendieron un total de 2.420 toneladas de antibióticos en 9 países (República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Holanda, Noruega, Suecia, Suiza y Reino Unido) de la Unión Europea (UE) de acuerdo con la Agencia Europea del Medicamento [33] (EMA, de sus siglas en inglés -*European Medicines Agency*-).

Con respecto a España, nuestro país, ocupó el cuarto lugar entre los países con mayor consumo de antibióticos con destino humano en la UE con 327 toneladas, por detrás de Francia (717 ton), Italia (632 ton) y Reino Unido (518 ton). Las penicilinas (79 mg/kg), macrólidos (10 mg/kg) y fluoroquinolonas (8 mg/kg) fueron los más consumidos según el informe JIACRA de 2017. En 2016 el consumo total de antibióticos en España siguió situándose entre los más elevados de Europa, registrando, desde el año 2012, una subida del 9,5% en el ámbito hospitalario [1], al igual que el consumo de cefalosporinas de 3ª y 4ª generación [43]. Sin embargo, de acuerdo con los datos estimados recogidos en el marco del Plan Nacional frente a la Resistencia Antimicrobiana (PRAN), el consumo total de antibióticos se redujo un 7,2% entre los años 2015 y 2018. Este dato sugiere una tendencia decreciente en el consumo de antibióticos en humana, aunque España continúa entre los países que más antibióticos consumen de la UE [59].

En relación al sector veterinario en España hubo una tendencia ascendente del uso de antibióticos del año 2010 al 2014, situándose en ese año como el país que más cantidad de antibióticos consumió en animales destinados al consumo humano en la UE con 2.964 ton (33% del total de antibióticos consumidos en la UE), le siguen Italia (1.432 ton), Alemania (1.306 ton) y Francia (762t). Los más consumidos fueron las tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas con 50, 38 y 16 mg/kg biomasa estimada, respectivamente, acorde con los datos obtenidos del informe JIACRA del 2017. A partir del 2014, en España se produjo una reducción del consumo estimada en un 14% hasta 2016 (de 418,8 mg/*Population correction unit* (PCU) a 362,4 mg/PCU en 2016) [1], seguramente relacionada con la disminución del 32,4% de las ventas de antibióticos en el país entre 2014 y 2017 [59]. Esta disminución constituyó un cambio de tendencia muy significativo. Actualmente, los β -lactámicos constituyen el 35,67% del consumo total (humana y

veterinaria) y son los segundos antimicrobianos más usados, por detrás de las tetraciclinas (45,35%) [43].

1.1.1 Los antibióticos β -lactámicos y su mecanismo de actuación

Los β -lactámicos son agentes bactericidas que se han desarrollado a partir de la penicilina y se caracterizan por poseer anillo β -lactámico y una cadena lateral variable (Figura 1). En función de su estructura, se dividen en: penicilinas (naturales y de amplio espectro), cefalosporinas (de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación), carbapenemas, monobactanes e inhibidores de las β -lactamasas (Figura 1 y Tabla 1) [49].

Tabla 1. Clasificación de los β -lactámicos por grupos y sub-grupos junto con ejemplos de los antibióticos más relevantes de cada uno.

Evantes de cada año.

Grupo	Antibiótico	
Penicilinas		
Penicilinas naturales	Penicilina G	Penicilina V
Amplio espectro	Ampicilina	Amoxicilina
Antiestafilocócicas	Oxacilina Cloxacilina	Dicloxacilina
Carboxipenicilinas	Ticarcilina Carbenicilina	Piperacilina
Cefalosporinas		
Primera generación	Cefadroxilo Cefazolina Cefalotina	Cefalexina Cefradina
Segunda generación	Cefuroxima Cefamandol	Cefaclor Cefoxitín
Tercera generación	Cefotaxima Ceftacidima Ceftriaxona	Cefixime Cefoperazona
Cuarta generación	Cefepime	Cefpirome
Quinta generación	Ceftarolina	
Carbapenémicos		
	Imipenem Meropenem	Ertapenem
Monobactamicos		
	Aztreonam	
Inhibidores de las β-lactamasas		
	Ácido clavulánico	Sulbactam Tazobactam

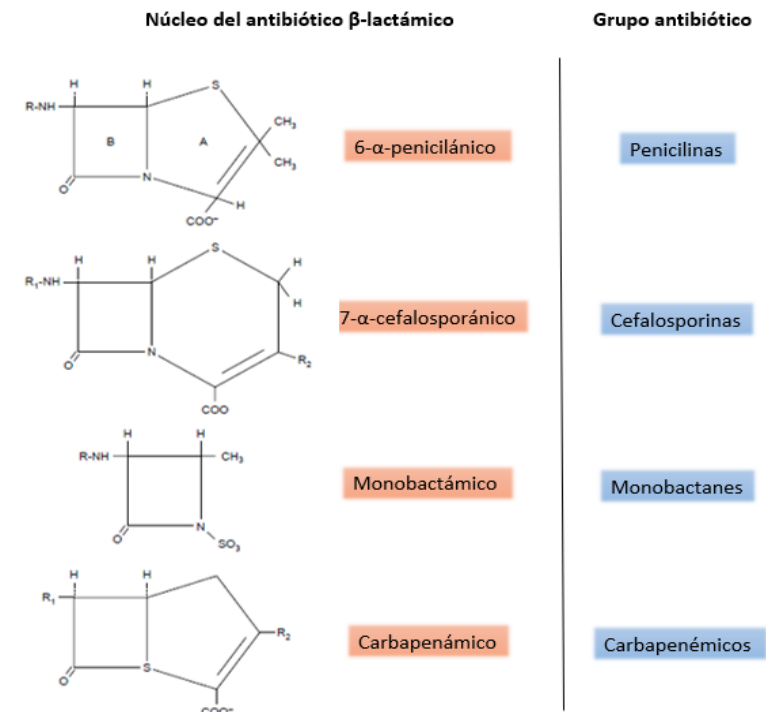


Figura 1. Estructura de los antibióticos β -lactámicos [49].

Los antibióticos β -lactámicos actúan a nivel de la pared de las bacterias. Las diferencias en el anillo y su decoración con cadenas laterales, así como la posición espacial del mismo, condicionan su afinidad por las denominadas proteínas fijadoras de penicilina (PBPs, de sus siglas en inglés *Penicilline Binding Proteins*) [49]. Las PBPs polimerizan la capa de peptidoglucano de la pared bacteriana. Los β -lactámicos emulan estructuralmente a los componentes del peptidoglucano, compitiendo así por la zona activa de las PBPs, donde establecen una unión covalente e inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. Esta alteración produce una descoordinación de las enzimas implicadas en el proceso de transpeptidación, generando lisis bacteriana [36].

La pared celular es esencial para la mayoría de microorganismos y su biosíntesis está bien conservada entre bacterias de diferentes grupos, así estos antibióticos actúan sobre un amplio espectro de bacterias, con ciertas excepciones. Además, tienen una menor toxicidad que otros antibióticos, una buena penetración en diferentes órganos, una buena capacidad de administración, y puedan usarse en una gran variedad de situaciones clínicas. Todo esto hace que sean muy atractivos de usar, especialmente cuando se desconoce el agente patógeno causante de la infección [63].

Sin embargo, la actividad de los β -lactámicos es limitada, ya que es necesario que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación para que puedan actuar, por lo que no son efectivos frente a formas latentes [36]. Tampoco son activos frente a micobacterias [49] las

cuales poseen una pared celular gruesa y con un alto contenido en lípidos (50-60%), lo que hace que su penetración sea lenta y disminuya su afinidad al ser sustancias poco lipofílicas [24]. Así mismo, no son activos frente a micoplasmas, pues carecen de pared celular, ni frente bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*, ya que no alcanzan concentraciones elevadas en el interior de la célula por su carácter lipofóbico [49]. Además, todas las enterobacterias de interés clínico, con la única excepción de *Salmonella* y muy probablemente de *Proteus mirabilis*, son portadoras de una betalactamasa cromosómica natural y propia de cada especie [53]. Finalmente, bacterias que inicialmente eran sensibles a β -lactámicos han sido capaces de adquirir resistencia frente a este grupo de antibióticos a través de diferentes mecanismos, que se describirán más adelante en este estudio.

1.1.1.1 Cefalosporinas

Las cefalosporinas se dividen en 5 grupos o generaciones en función del aumento de su espectro de actuación. Las de primera generación son muy activas frente a los cocos Gram positivos, sin embargo, las sucesivas generaciones han perdido parte de esa actividad, en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos Gram negativos. Por otro lado, todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la meticilina y *Listeria monocytogenes* [49]. Las cefalosporinas de tercera y cuarta generación se utilizan contra infecciones polimicrobianas que involucran bacilos gramnegativos y cocos grampositivos. Las cefalosporinas de tercera generación (C3G) son activas frente a *Haemophilus influenzae* y frente a algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae* que no producen betalactamasas de tipo AmpC o BLEEs (como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* o *Proteus mirabilis*). Cefotaxima es una C3G con un espectro de actividad amplio contra cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos [68] y cefotaxima que, además, tiene efecto sobre bacterias anaerobias [14].

1.1.1.2 Inhibidores de β -lactamasas

Los inhibidores de β -lactamasas no son antibióticos propiamente dichos, sino moléculas con una elevada afinidad por las β -lactamasas, enzimas producidas por las bacterias que degradan los antibióticos β -lactámicos. Estos inhibidores se unen irreversiblemente a las β -lactamasas, inactivándolas. Se suelen administrar conjuntamente con antibióticos β -lactámicos para evitar su inhibición mediante β -lactamasas y potenciar su efecto bactericida, ya que los protegen de la acción enzimática de las β -lactamasas. Su aportación fundamental es, por lo tanto, restaurar la actividad del β -lactámico coadministrado [49]. El ácido clavulánico es el más usado. Tiene una estructura similar a la penicilina, pero modificada (sustitución del átomo de azufre en la posición 3 por un átomo de oxígeno) (Figura 2), en la cual reside su función como inhibidor de β -lactamasas [49].

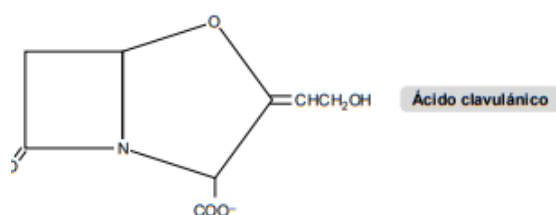


Figura 2. Estructura química del ácido clavulánico [49].

1.1.2 Clasificación de los antibióticos según su importancia crítica

La Organización Mundial de la Salud (OMS) emite desde el 2005 el listado de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana, agrupándolos en tres categorías: de importancia crítica, muy importantes o importantes. En el caso de la sanidad animal, la EMA lanzó a consulta pública a principios de 2019 una nueva categorización de los antibióticos de uso veterinario que incluye todos los tratamientos y los clasifica según el riesgo que representa su uso, con el objetivo de mitigar el riesgo para la salud humana [34]. Esta clasificación distingue 4 categorías (Tabla 2): Categoría A (“Evitar”) en la que encontramos los antimicrobianos no autorizados en medicina veterinaria en la UE. Su uso en animales de abasto está prohibido, solo se pueden administrar a animales de compañía de forma excepcional, de conformidad con la “prescripción en cascada”; Categoría B (“Restringir”) son los antibióticos cuyo uso solo debe considerarse para el tratamiento de afecciones clínicas cuando no existen antimicrobianos efectivos en las categorías C o D. Están incluidas las sustancias definidas como Antimicrobianos de Importancia Crítica de Máxima Prioridad por la OMS (ej. cefalosporinas de tercera, cuarta y quinta generación, glicopéptidos, macrólidos y cetólidos, polimixinas y quinolonas), con la excepción de los macrólidos y aquellos que no están autorizados como medicamentos veterinarios en la UE; Categoría C (“Precaución”), abarca los antimicrobianos que solo deben usarse cuando no haya opciones efectivas en la categoría D; y Categoría D (“Prudencia”), incluyen los antibióticos que pueden usarse de manera prudente, evitando su uso innecesario, en tratamientos largos y/o grupales. Su uso en medicina veterinaria supone un riesgo bajo para la salud pública. Varias de estas sustancias están clasificadas como Antibióticos de Importancia Crítica por la OMS (ej. penicilinas).

Tabla 2. Categorización de los antibióticos en veterinaria según la importancia crítica y las familias de antibióticos que corresponden a cada categoría [34].

Categoría	Familia de antibióticos	
Categoría A (evitar uso)	▪ Carbapenemas y otros penemas ▪ Lipopéptidos ▪ Fosfomicina ▪ Cefalosporinas de última generación ▪ Glicopéptidos ▪ Gliciliclinas ▪ Monobactámicos ▪ Amidinopenicilinas	▪ Ácido pseudomónico ▪ Oxazolidinonas ▪ Carboxipenicilinas y ureidopenicilinas con inhibidores de betalactamasas ▪ Riminofenazinas ▪ Antibióticos para el tratamiento de tuberculosis y otros micobacterianos
Categoría B (restringir)	▪ Cefalosporinas de 3ª y 4ª generación	▪ Polimixinas ▪ Quinolonas
Categoría C (precaución)	▪ Aminoglucósidos ▪ Aminopenicilinas combinadas con betalactamasas ▪ Anfenicoles	▪ Rifamicinas ▪ Cefalosporinas de 1ª y 2ª generación ▪ Macrólidos ▪ Lincosamidas ▪ Pleuromutilinas
Categoría D (prudencia)	▪ Aminopenicilinas ▪ Polipéptidos cíclicos (bacitracina) ▪ Nitrofuranos ▪ Nitroimidazoles ▪ Tetraciclinas	▪ Penicilinas: naturales, de espectro estrecho y sensibles a betalactamasas ▪ Antibacterianos esteroideos (ácido fusídico) ▪ Sulfonamidas, inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa y sus combinaciones

La falta de desarrollo de nuevos antibióticos convierte en fundamentales las recomendaciones sobre el uso racional de los antibióticos existentes. La actualización periódica de esta clasificación es absolutamente necesaria para proteger la eficacia de estos medicamentos. Cabe resaltar que los antibióticos β -lactámicos, objeto de este estudio, aparecen en todas las categorías de dicha clasificación, haciendo que su uso eficiente y el control de las resistencias a estos antibióticos sean fundamentales tanto para la salud pública como animal.

1.2. El desarrollo de resistencias a antibióticos

Se entiende por resistencia a antibióticos (RA) la capacidad que tienen las bacterias de convertirse en resistentes frente a antibióticos frente a los que eran susceptibles [56]. En parte, es el resultado de la presión selectiva generada por el uso de antibióticos conduciendo a la selección y mantenimiento de genes exitosos o de elementos y/o clones genéticos móviles [60].

La RA puede ser natural o adquirida. Cuando todas las cepas pertenecientes al mismo grupo bacteriano son resistentes a un antibiótico, se habla de resistencia natural. Ésta puede producirse por particularidades en su estructura (ej. las micobacterias y micoplasmas son naturalmente resistentes a los β -lactámicos), por inactivación del antibiótico mediante producción de enzimas que hidrolizan o modifican la molécula (producción natural de β -lactamasas) y también por bacterias productoras de antibióticos, que deben protegerse frente a sus propias sustancias tóxicas utilizando mecanismos de resistencia [57]. Cuando la resistencia sólo aparece en ciertas cepas de una especie normalmente sensible se habla de resistencia adquirida. Esta es la forma más habitual y puede darse por mutación o transferencia genética horizontal (TGH) [57].

Las mutaciones aparecen espontáneamente según el tipo de bacterias y las características ambientales [57]. Se dan, sobre todo, en ambientes en los que hay poca probabilidad de producirse el intercambio genético, por ejemplo, en las infecciones crónicas, donde se combina la baja disponibilidad de ADN exógeno con la elevada presión selectiva ejercida por el tratamiento antibiótico aplicado durante meses [7]. Las mutaciones aleatorias de los genes que codifican las enzimas han dado lugar a catalizadores modificados con un espectro de resistencia cada vez mayor [39].

La TGH permite una difusión rápida y extensa de la información genética. Los mecanismos involucrados son la transducción, la transformación y la conjugación [57]. En la transducción el vector es un bacteriófago que es capaz de transferir un fragmento de ADN de una bacteria a otra. El bacteriófago, al ingresar en una bacteria, puede introducir algunos nuevos genes de las bacterias que ha infectado previamente, como los genes de resistencia bacteriana a los antibióticos. La transducción es un mecanismo de transferencia muy eficaz, pero debido a la estrecha especificidad de la relación virus-bacteria está limitada a intercambios entre microorganismos filogenéticamente próximos, fundamentalmente pertenecientes al mismo género [57]. La transformación permite la adquisición e incorporación de ADN exógeno desnudo. La bacteria capta un fragmento de ADN presente en el medio externo, procedente de bacterias lisadas y lo integra en su material genético. La información transmitida por el mecanismo de transformación presenta un carácter más universal y puede ser asimilada por cualquier bacteria, permitiendo incluso la creación de genes híbridos muy resistentes a los antibióticos [57]. La conjugación es un proceso en el cual el ADN se transfiere de una bacteria donante a una bacteria receptora por medio de un mecanismo que implica un estrecho contacto celular. Es el modo de transferencia responsable de la mayoría de TGHs. Consiste en la transmisión de una hebra de ADN de la bacteria donante a la receptora, obteniendo así una copia de la información contenida en dicha hebra. Ambas bacterias sintetizan de nuevo la hebra

complementaria, de modo que al final de la conjugación los dos microorganismos son resistentes, lo que amplía notablemente la resistencia [57].

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN bicatenario que poseen la capacidad de replicarse independientemente del sistema de duplicación del cromosoma bacteriano. Pueden promover la TGH entre diferentes especies por conjugación [63]. Los plásmidos pueden adquirir sucesivamente diferentes genes de resistencia. En ocasiones, un solo plásmido puede determinar la resistencia a varias familias de antibióticos en un microorganismo, cuando éste vehicula varios genes de resistencia, de modo que, al transmitirse, permite a la bacteria volverse multiresistente en una sola etapa [57], lo cual apoya la idea de la co-selección de otros genes de resistencia. Además, los transposones, secuencias móviles de ADN de doble cadena que pueden replicar e insertarse a sí mismos, permiten el intercambio aleatorio entre secuencias no homólogas de ADN. Éstos albergan genes determinantes de resistencia, pudiendo insertarlos en el cromosoma [57]. De hecho, permiten la translocación de los genes de resistencia del cromosoma bacteriano a un plásmido y viceversa, o de un plásmido a otro dentro de la misma bacteria, de tal forma que se amplían enormemente las posibilidades de transferencia de la información. El intercambio de transposones entre células se puede realizar mediante conjugación o a través de elementos móviles (ej. plásmidos) [65].

1.2.1 Resistencias a los antibióticos en el sector porcino

A nivel mundial, la UE-28 es el segundo productor de carne de porcino, después de China. Actualmente, España es la tercera potencia productora (después de China y EEUU), mientras que, a nivel europeo, desde el 2015 España es el mayor productor de porcino. El sector porcino ocupa, en España, el primer lugar en cuanto a su importancia económica alcanzando cerca del 39% de la Producción Final Ganadera [47]. Más del 50% del censo se concentra en el noroeste español (Aragón y Cataluña). La producción de carne de porcino supone el 64,5% de la producción total de carne en España [3]. Siendo la carne de cerdo la segunda más consumida en nuestro país (29%) después de la carne de pollo (37%) [48].

En 2016 el sector porcino fue el que mayor cantidad de antibióticos consumió del sector veterinario español, sobre todo se marca la diferencia con las polimixinas, β -lactámicos y fluoroquinolonas (Figura 3) (JIACRA, 2018). El uso masivo de antibióticos en veterinaria y en particular en este sector crea una presión selectiva que contribuye a la emergencia de las resistencias frente a antibióticos, haciendo del sector porcino una fuente potencial de bacterias resistentes [19]. En este sentido, la administración de antibióticos por vía oral ha sido una práctica habitual en las granjas porcinas, lo que ha supuesto que se aplique un tratamiento antibiótico tanto a animales enfermos como sanos, generando una mayor presión de selección

[10]. Se ha observado así mismo que incluso animales no tratados con antibióticos podrían estar expuestos a dosis sub-terapéuticas de los mismos cuando se alojan con otros animales tratados [44]. Todo ello contribuye a su vez a la contaminación ambiental con bacterias resistentes que son eliminadas a través de las heces, incrementando el riesgo de dispersión de las mismas en el medio ambiente [41].

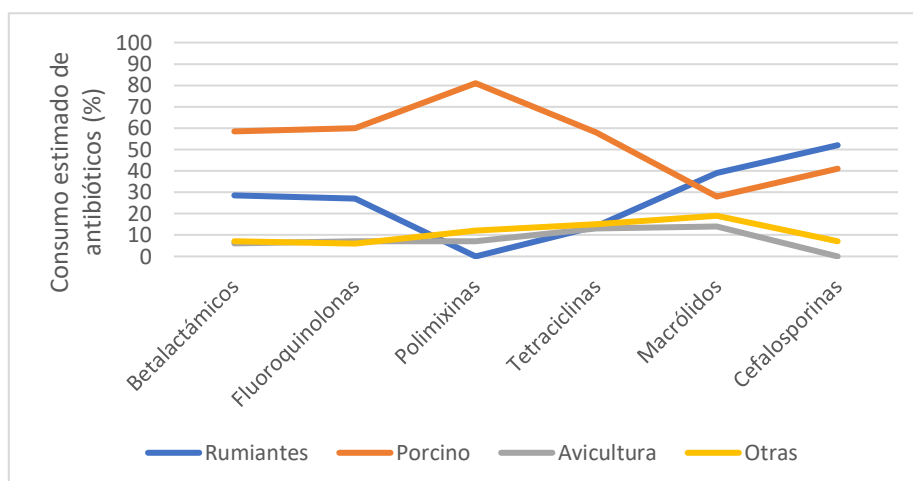


Figura 3. Distribución del consumo estimado de las familias de antibióticos por las especies productoras de alimentos más relevantes (rumiantes, porcino, avicultura y otras especies) en el 2016 [43].

1.2.2 Mecanismos y transmisión de resistencias frente a antibióticos β -lactámicos

Las bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de amplio espectro pueden adquirir la resistencia a los β -lactámicos mediante los siguientes mecanismos: (1) alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa. Si disminuye el diámetro o la producción de poros proteicos (porinas) de la membrana externa, se dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas como los β -lactámicos; (2) modificación de la diana del antibiótico. Mutaciones en las PBP que afecten a la unión con el antibiótico, producen una pérdida de afinidad a los β -lactámicos. Este es el mecanismo más frecuente en cocos Gram positivos, pero también se da en Gram negativos; (3) producción de enzimas β -lactamasas, que son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico. Este mecanismo es el más frecuente en la familia *Enterobacteriaceae* [35; 11]; (4) expresión de bombas de eliminación activa que expulsan el antibiótico conforme se absorbe [53]; y (5) mediante la formación de *biofilms*. Este mecanismo es independiente de los anteriores, ya que una bacteria sensible sin base genética de resistencia conocida, puede mostrar una sensibilidad reducida como consecuencia de su capacidad para formar *biofilms*.

En este estudio nos vamos a centrar en las resistencias generadas por la producción de β -lactamasas. El grado de resistencia que poseen se correlaciona con su concentración, la afinidad

por los diferentes β -lactámicos y propiedades hidrolíticas. La producción puede ser constitutiva (se producen siempre), es el caso de las β -lactamasas plasmídicas en bacterias Gram negativas, o inducible (se producen solo en presencia de un β -lactámico). Las β -lactamasas cromosómicas producidas fundamentalmente por bacterias Gram negativas pueden ser constitutivas o inducibles.

La producción de β -lactamasas está controlada por genes (*bla*), los cuales pueden estar ubicados en el cromosoma o en plásmidos. Estos genes *bla* codifican enzimas BLEE, pAmpC o carbapenemasas asociadas frecuentemente con elementos genéticos móviles como los transposones, integrones y plásmidos [63]. La resistencia a nivel cromosómico aparece por mutación mientras que los plásmidos son transferibles entre bacterias [49]. Siendo la transmisión mediada por plásmidos el método más frecuente de TGH de genes *bla* [55].

1.2.3 Clasificación de las β -lactamasas

Las enzimas β -lactamasas pueden clasificarse molecular o funcionalmente, ambas clasificaciones están correlacionadas (Tabla 3). La clasificación molecular o de Ambler se basa en la homología de la secuencia de aminoácidos, agrupándose en cuatro clases moleculares: A, B, C y D. La clasificación funcional divide a las β -lactamasas en 3 grupos, (1) cefalosporinasas que corresponden a la clase C de Ambler, son conocidas como las β -lactamasas AmpC. Tienen mayor actividad contra las cefalosporinas y, normalmente, resisten la inhibición del ácido clavulánico, (2) serina- β -lactamasas que utilizan serina para realizar la hidrólisis. Se corresponden a los grupos A y D, son el grupo más amplio de β -lactamasas debido al incremento de BLEEs. Tienen una gran afinidad por las monobactamas y son inhibidas por el ácido clavulánico. Las β -lactamasas de la clase D se conocen comúnmente como OXA β -lactamasas y (3) metalo- β -lactamasas incluyen las de la clase B, que requieren la presencia de iones de Zn divalentes para realizar la hidrólisis. Se distinguen de las anteriores por su capacidad para hidrolizar carbapenemas, aunque algunas serina- β -lactamasas están comenzando a adquirir esta capacidad [11; 40].

Las enzimas con mayor importancia clínica de la clase A son las BLEEs que son resistentes a la penicilina, cefalosporinas de amplio espectro (primera y segunda generación) y aztreonam. Sin embargo, no hidrolizan los carbapenemas [63] y son inactivadas por los inhibidores de β -lactamasas disponibles comercialmente como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam [58]. Las familias principales de éstas son los tipos TEM-, SHV- (β -lactamasas clásicas) y CTX-M [11]. Estas β -lactamasas no confieren resistencia a la cefoxitina ni a los carbapenemas. Las BLEEs de tipo TEM y SHV, son el resultado de mutaciones puntuales simples y suelen ofrecer mayor resistencia frente a ceftazidima, mientras que otras β -lactamasas, como las de tipo CTX-M,

proceden de las β -lactamasas codificadas cromosómicamente producidas de forma natural por enterobacterias y son más resistentes frente a cefotaxima [4]. Las TEM-1 son las más comunes en las bacterias Gram negativas, la cual es capaz de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas [9].

Las β -lactamasas cAmpC pertenecientes a la clase C confieren resistencia a las combinaciones de C3G e inhibidores de β -lactamasas (Ej. amoxicilina-clavulánico), pero no frente a los carbapenemas. A principio de los 2000 se observó un incremento de genes *ampC* en plásmidos (pAmpC) que se pueden distribuir fácilmente mediante transferencia horizontal entre las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas derivan de aquellas que poseen los productores cromosómicos [63] y confieren resistencia frente a penicilinas, cefoxitina y cefalosporinas de amplio espectro como cefotaxima y ceftazidima [4]. A diferencia de las enzimas de clase A, cAmpC y pAmpC se inactivan levemente por los inhibidores β -lactámicos más comunes, pero las cefalosporinas de cuarta generación permanecen en los rangos de susceptibilidad [35].

Las carbapenemasas son β -lactamasas capaces de hidrolizar los antibióticos carbapenemas. Se han identificado enzimas de este tipo en las 4 clases estructurales [63], siendo las más relevantes las metalo- β -lactamasas (clase B). Las enzimas principales de la clase B son las IMP y VIM que tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos β -lactámicos con excepción del aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam [52].

Tabla 3. Clasificación molecular y funcional de las β -lactamasas con sus características más relevantes.

Clase funcional	Clase molecular (Grupo Bush y Jacoby, 2009)	Enzimas	Sustrato preferente	Inhibidores
1	C (1 y 1e)	AmpC	Cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación e inhibidores de β -lactamasas (AC)	Cloxacilina, aztreonam y ácido borónico y sus derivados
2	A (2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2e, 2f)	BLEEs (SHV, TEM, CMY, CTX-M, CMT)	Penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro (1ª y 2ª generación), monobactamas, carbencilina	AC, sulbactam, tazobactam y carbapenemas
	D (2d, 2de, 2e)	OXA β -lactamasas	Cefalosporinas de amplio espectro, coloxacina y carbapenemas	AC
3	B (3a, 3b)	Metallo- β -lactamasas (IMP y VIM)	Todos los β -lactámicos incluyendo carbapenemas, excepto aztreonam	EDTA

aa: aminoácidos. BLEEs: betalactamasas de espectro extendido, TEM: temocillin, CMT: complex mutant TEM, EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, AC: Ácido clavulánico, OXA: oxaciclina,

La presencia de β -lactamasas limita de forma progresiva las posibilidades de emplear antibióticos previamente activos, jugando un papel crítico en la selección de una terapia adecuada al obligar a elegir antibióticos diferentes a las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas [11]. La disminución de su efectividad contra antibióticos de primera línea por la aparición de resistencias es un fenómeno mundial, que está ocasionando que se recurra a antibióticos de segunda y tercera línea, que son los antibióticos a los que se recurre cuando los indicados para el tratamiento no funcionan (ej. amikacina) [46]. Esta reducción de opciones de tratamientos en humana se agrava por la capacidad de los patógenos de transferirse directamente de los animales a los humanos y con ellos las resistencias que portan, como es el caso de *Salmonella* [63].

1.2.4 La lucha contra la resistencia antimicrobiana

El aumento de la prevalencia de resistencia a los antimicrobianos se asocia con varios factores: 1) el elevado uso de antibióticos en medicina humana; 2) el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en animales de abasto; 3) el tratamiento terapéutico con antibióticos tanto en animales de producción como de compañía; y 4) el uso de pesticidas en agricultura y de biocidas en productos de limpieza domésticos [20]. Su control, por lo tanto, implica una actuación global desde diferentes enfoques (médico, veterinario y ambiental). Esta situación ha promovido el desarrollo del enfoque *One Health* o “Una única Salud”, que propugnan los organismos internacionales. Consiste en integrar y coordinar actuaciones en áreas de salud humana, sanidad animal y medioambiente [59]. Este enfoque reconoce que estos tres ámbitos están interconectados, y la resistencia antibiótica tiene enlaces claros a cada uno de estos tres dominios [62].

En lo que concierne al ámbito veterinario, la UE restringió el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en animales en 1999 y los prohibió completamente en 2006 [6]. Sin embargo, esta prohibición condujo a un aumento en el uso de antibióticos con objetivos terapéuticos, lo cual, junto con las mejoras en la producción de fármacos, haciéndolos más baratos, fomentó el uso de antibióticos sin receta del uso de antibióticos, su diseminación ocurre de forma relativamente fácil mediante la contaminación cruzada entre animales por material fecal, especialmente aquellos procedentes de la producción intensiva de ganado [28]. Esto ha contribuido también, en parte, al desarrollo de cepas resistentes a antibióticos en humanos [15]. Las bacterias resistentes procedentes de los animales pueden llegar al hombre indirectamente por la cadena alimentaria a través del consumo de alimentos contaminados o tras el contacto directo con animales infectados con dichas bacterias [15].

En vistas a proteger la salud pública, en noviembre del año 2011, el Parlamento Europeo publicó una resolución no legislativa por la que se estableció un Plan de Acción sobre Resistencias Antimicrobianas (2011-2016) [66] que estimuló la puesta en marcha de planes nacionales en 13 países, incluido España, con el objetivo de establecer una estrategia común para combatir las resistencias. Finalmente, en 2014 España aprobó su propio Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos (PRAN) que promueve, entre otras cosas, la reducción del uso de antibióticos en animales.

1.3. El agente zoonótico *Salmonella*: un patógeno multi-resistente

Salmonella es un género de bacterias perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*. Está formado por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (V). *S. enterica* se subdivide a su vez en seis subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI). Las subespecies además se dividen en serotipos en función del antígeno somático (O), los antígenos flagelares (H1 y H2) y, en ocasiones, antígenos capsulares (Vi). *Salmonella* es un Gram negativo con forma bacilar, anaerobio facultativo, no produce cápsula (con excepción de *S. Typhi*) ni esporas y son móviles por flagelos peritricos. La mayoría de las salmonelas presentan dos tipos diferentes de proteínas flagelares, denominados de fase 1 y de fase 2, que se corresponden con los antígenos H1 y H2. Sin embargo, algunos serotipos son monofásicos, es decir, sólo son capaces de producir un tipo de flagelina [25]. Las principales características fisiológicas y bioquímicas de este género se describen en Cox (1999) y Farmer et al. (2007). El reservorio natural de todas ellas es el tracto digestivo de animales vertebrados.

Algunos de los serotipos de *Salmonella* están adaptados a un hospedador específico y hay otros serotipos no adaptados a ningún hospedador concreto, es decir, pueden infectar a un amplio rango de animales, incluido al ser humano, por lo que poseen un gran potencial zoonótico, como es el caso de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* [51]. La mayoría de los serotipos no son patógenos en su hospedador animal natural, siendo el hombre un hospedador accidental que se infecta a través de alimentos contaminados, desarrollando una enterocolitis [25]. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* patógenos para el ser humano pertenecen a la subespecie I [31]. Entre ellos se encuentran *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, causantes de las fiebres tifoideas y paratifoideas, respectivamente, y numerosos serotipos no tifoideos causantes de gastroenteritis [2].

Desde hace una década *Salmonella* es de los patógenos más frecuentes transmitidos por alimentos en la UE [21]. Los 5 serovares más frecuentes en casos de salmonelosis humana son

S. Enterica, *S. Typhimurium*, variante monofásica de *S. Typhimurium*, *S. Infantis* y *S. Newport* [31]. El serotipo *S. Typhimurium* infecta sobre todo en ganado porcino y vacuno y *S. Enteritidis* se aísla principalmente de aves, huevos y derivados. La enfermedad está asociada principalmente al consumo de huevos y carne de pollo, pero en los últimos años están aumentando los casos relacionados con el consumo de carne de cerdo [29], ya que, se transmite a través de carne de cerdo normalmente cruda y lista para comer [5]. Por ello, la UE ha establecido las bases para la elaboración de programas de control de salmonelosis específicos para cada país recogidas en el Reglamento (CE) Nº 2160/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. Este Reglamento se complementa con la Directiva 2003/99/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.

En los últimos años, los serotipos de *Salmonella* que fueron aislados en mayor proporción en cerdos sacrificados en mataderos de España fueron *S. 1,4, [5],12:i:-* (9,08%), seguido por *S. Rissen* (7.99%) , *S. Typhimurium* (7.36%), *S. 4,5,i:-* (6.06%) y *S. Derby* (5,09%). *S. Typhimurium* es aislada con regularidad [50]. En Europa, *S. Typhimurium* es uno de los principales serotipos asociados con la salmonelosis humana y su variante monofásica se considera un serotipo atípico y emergente, que comparte casi todos los factores antigénicos con *S. Typhimurium* excepto la producción del flagelo H2 [64]. En general, las cepas monofásicas pueden aparecer como evolución de cepas ancestrales que, por diferentes eventos genéticos, han perdido los genes o la capacidad de expresión del antígeno flagelar H2 [25]. La variante monofásica de *S. Typhimurium* presenta un mismo grado de virulencia que las cepas patógenas de *S. Typhimurium*, tanto en animales como en humanos [27], siendo el cerdo el principal reservorio [31]. La EFSA ha considerado que las cepas emergentes de esta variante monofásica de *S. Typhimurium* suponen un riesgo para la Salud Pública comparable al de otras cepas de *S. Typhimurium* causantes de epidemias de infección generalizadas en las últimas décadas [26].

En los años 2000 los serotipos más involucrados en la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro fueron *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, lo cual no es sorprendente, ya que son los serotipos más frecuentes en muchos países. En *S. Typhimurium* se detectaron al menos 18 enzimas diferentes, incluidas algunas ampliamente distribuidas como las del grupo TEM y CMY [4]. En el 2011 la prevalencia de resistencia frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *Salmonella* spp. era muy baja (0,04%), sin embargo, ha incrementado notablemente hasta el 2016 (1,37%) [43].

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde el inicio del uso de los antibióticos se han generado organismos resistentes a éstos, sin embargo, no ha sido hasta las últimas décadas cuando se ha considerado que estamos en una situación alarmante. El incremento de bacterias resistentes a los antibióticos, ha estimulado la investigación de otras alternativas para tratar infecciones tanto en Salud Pública como en Sanidad Animal. Los β -lactámicos son una familia de antibióticos afectada por las resistencias a los antibióticos, sobre todo por el aumento de microorganismos productores de β -lactamasas. Esta resistencia es específica en función del tipo de β -lactamasas.

Uno de los géneros bacterianos afectados por este tipo de resistencia es *Salmonella*, el segundo patógeno zoonótico más prevalente en la UE y en el cual se ha observado una tendencia creciente de la resistencia a C3G. Aprovechando que la Unidad de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) tenían dos colecciones de cepas de *Salmonella* recogidas en el periodo 2008-2009 y en 2018 en granjas de porcino del Noroeste de España (Aragón), respectivamente, el objetivo general de este estudio fue evaluar la evolución de la resistencia a β -lactámicos en aislados de *Salmonella* procedentes de ganado porcino de nuestra región. En este contexto, los subobjetivos de este estudio son:

1. Evaluar la prevalencia de la resistencia a β -lactámicos en un panel de cepas seleccionadas en ambos periodos.
2. Caracterizar el tipo de resistencia (BLEE y/o AmpC) en aquellos aislados que resulten resistentes.

3. METODOLOGÍA

3.1. Aislados de *Salmonella* utilizados

Periodo 2008-2009

Se utilizaron un total de 270 cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes a una colección de 625 cepas de la Unidad de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Todas las cepas habían sido aisladas de nódulos linfáticos mesentéricos de cerdos procedentes de 75 granjas ubicadas en la Comunidad Autónoma de Aragón [67]. Las cepas fueron serotipadas y el patrón de resistencia a 19 antibióticos fue determinado previamente, pero su resistencia frente a los β -lactámicos no había sido analizada. Las 270 cepas utilizadas en este estudio se seleccionaron en base a: 1) representar a todos los rebaños positivos analizados, y 2) representar a los diferentes serotipos presentes en las explotaciones positivas.

Periodo 2018

En 2018 se llevó a cabo un nuevo estudio en 29 rebaños de porcino de la misma zona geográfica, en el contexto de otro proyecto de investigación desarrollado en el CITA (resultados no publicados). En este caso, se recogieron muestras fecales (grupos) de 10 corrales de cada rebaño. Se aisló *Salmonella* en 17 rebaños (58,6%). Un total de 59 aislados de *Salmonella* fueron utilizados para este estudio.

El perfil de resistencia de todos estos aislados se habían analizado previamente en el laboratorio de Microbiología del CITA mediante *Sensititre Gram Negative MIC plate* (Thermo Fisher Scientific, East Grinstead, UK) bajo la dirección de Clara Marín (resultados aún no publicados). De esta colección se seleccionaron los que resultaron fenotípicamente resistentes a C3G. Previo a su análisis, todas las cepas se descongelaron y sembraron en medio de cultivo agar nutritivo durante 24 horas (± 2 horas) a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

3.2. Detección fenotípica de cepas productoras de BLEE y AmpC

Para determinar si las cepas producían β -lactamasas de tipo BLEE y/o AmpC, se utilizó el kit de difusión en disco "*Total ESBL+AmpC Confirm Kit: ESBL + AmpC*" (ROSCO Diagnostika, Taastrup, Dinamarca). La técnica se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, se prepararon suspensiones bacterianas y se ajustaron a 0,5 en la escala de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ bacterias/ml) en suero salino fisiológico. Parte de la suspensión bacteriana se recogió con un hisopo y se sembró en masa sobre una placa Mueller-Hinton (MH) (Oxoid Limited, Basingstoke, Reino Unido). Finalmente, se depositaron sobre la siembra los discos que contienen cefotaxima y ceftazidima combinados con ácido clavulánico y/o cloxacilina y se incubaron posteriormente a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). El ácido clavulánico y la cloxacilina

son inhibidores de BLEE y AmpC, respectivamente, por lo que permiten determinar el tipo de resistencia (BLEE y/o AmpC). Transcurridas las 18 horas (± 2 horas) de incubación del cultivo, se determinó la formación de un halo de inhibición y se procedió a la medición del diámetro.

Para medir el diámetro de los halos de inhibición se tomó como límite la primera colonia más cercana al disco con los antibióticos. Para la interpretación de los resultados, se siguió las instrucciones del fabricante del *kit*. Así, para determinar si una cepa es productora de β -lactamasas frente a C3G, debe haber una diferencia > 5 mm entre el halo de inhibición causado por el antibiótico, ya sea cefotaxima (CTX) o ceftazidima (CAZ), junto con ácido clavulánico (C) o cloxacilina (CX) y el antibiótico con ambos componentes (CTXCC / CAZCC). En función de si el halo de menor tamaño es el que contiene el ácido clavulánico (CTX + C / CAZ + C) o con cloxacilina (CTXCX / CAZCX), la resistencia puede ser del tipo BLEE o AmpC. Si el halo de menor tamaño corresponde al antibiótico que lleva CX, la resistencia será de tipo BLEE, ya que éste compuesto inhibe la acción de las enzimas AmpC. Sin embargo, si el halo reducido es el del disco con C, la resistencia será del tipo AmpC, porque el C inhibe la acción de las enzimas BLEE.

3.3. Análisis estadístico

Se estimó la prevalencia de resistencia a C3G y su correspondiente intervalo de confianza del 95% (95% IC). La comparación de la prevalencia de las resistencias en los dos periodos estudiados se evaluó mediante el test exacto de Fisher. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa MedCalc v. 18.10 (MedCalc, Ostend, Bélgica).

3.4. Electroforesis en campo pulsado

Para determinar la relación filogenética de las cepas productoras de BLEE y AmpC, se utilizó la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE, de sus siglas en inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), la cual ha sido previamente utilizada para aislados de *Salmonella* [61] y que ha sido optimizada en nuestro laboratorio [2]. Se eligió esta técnica porque se considera la técnica de referencia para la tipificación genotípica de *Salmonella*. Para ello, se purificó el ADN de las cepas de *Salmonella* y posteriormente se digirió con la enzima de restricción *XbaI*. Los productos resultantes de la digestión se separaron en un gel de agarosa el cual fue sometido a electroforesis de campo pulsado bajo las condiciones previamente descritas [2]. Como marcador de tamaño molecular se utilizó una cepa *S. Braenderup*. Para el análisis de los patrones de bandas observados se utilizó el software BIONUMERICS (version 6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). El análisis lo realizó Alberto Cebollada-Solanas de la Universidad de Biocomputación, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (CIBA, Zaragoza).

3.5. Caracterización genética de las cepas productoras de BLEE y AmpC

La caracterización genética de las cepas de *Salmonella* productoras de BLEE/AmpC del muestreo de 2008-2009 se evaluó mediante la técnica de PCR multiplex para la detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, *bla*_{CMY} y *bla*_{SHV}, siguiendo las condiciones descritas en Dallenne et al. (2010). Para identificar variantes genéticas se utilizó la secuenciación de Sanger y el análisis de secuencias. En el caso de las cepas de *Salmonella* productoras de BLEE/ AmpC aisladas en 2018, se realizó un análisis de Secuenciación Completa del Genoma. Ambos análisis se realizaron en el laboratorio del Dr. Bruno González-Zorn (Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria - VISAVET-, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid).

4. RESULTADOS

4.1. Prevalencia de cepas de *Salmonella* productoras de BLEE y AmpC

De los aislados de *Salmonella* del periodo 2008-2009 analizados, solo el aislado 464, correspondiente al serotipo S. Bredeney, mostró resistencia mediante producción de AmpC según el kit de difusión en disco utilizado (Figura 4).

Respecto al año 2018, se seleccionaron 6 aislados (3, 101, 102, 103, 106 y 107) que habían mostrado resistencia a ceftazidima y cefotaxima tras el screening previo realizado en el CITA. En los 6 aislados se observaron diferencias entre CTXCC y CTXCX y entre CAZCC y CAZCX superiores a 5 mm indicando la producción de BLEEs. La figura 4 muestra los resultados obtenidos con el aislado 106.

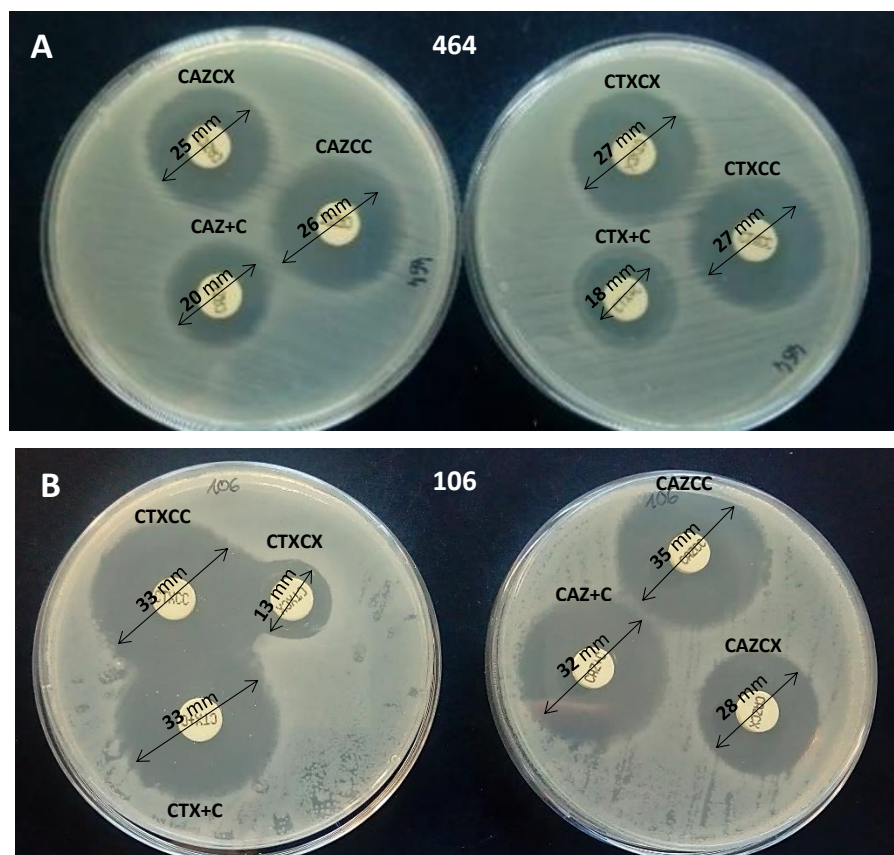


Figura 4. Crecimiento de las cepas 464 (A), aislada en 2008-2009, y 106 (B), aislada en 2018, en medio sólido MH en presencia de diferentes antibióticos. Los diámetros de los halos de inhibición resultantes (en mm) resultantes fueron determinados mediante el test ROSCO. En el **panel A**, una diferencia de 6 y 9 mm (>5 mm) entre los halos de inhibición de los discos CAZCC y CTXCC en relación a los discos CAZ+C y CTX+C, respectivamente, indica la producción de β -lactamasas del tipo AmpC. En el **panel B**, Un halo superior a 5 mm entre los halos de inhibición de los discos CTXCC y CAZCC en relación a los discos CTXCX y CAZCX (20 y 7 mm, respectivamente), indica la producción de β -lactamasas del tipo BLEE.

CTXCX: cefotaxima con cloxacilina; **CTX+C:** cefotaxima con ácido clavulánico. **CTXCC:** cefotaxima con cloxacilina y ácido clavulánico. **CAZCX:** ceftazidima con cloxacilina. **CAZ+C:** ceftazidima con ácido clavulánico. **CAZCC:** ceftazidima con cloxacilina y ácido clavulánico.

Las prevalencias de *Salmonella* resistentes a C3G tanto a nivel individual como de rebaño en las dos colecciones de aislados analizadas se exponen en la tabla 4. Observándose una prevalencia de 0,37% (IC del 95%: 0,07-2,1) y de 10,2% (IC del 95%: 4,7-20,5) en la colección del 2008-2009 y 2018, respectivamente. Siendo la prevalencia del 2018 significativamente mayor que la obtenida en 2008-2009 (Tabla 4).

Sin embargo, los 6 aislados resistentes del 2018 procedían de sólo dos rebaños de cerdos diferentes, ya que cinco de ellos (101, 102, 103, 106 y 107) pertenecían a la misma explotación, así que surgió la sospecha de si podrían pertenecer al mismo linaje genético. Para determinar esto fueron analizados por PFGE. Ciertamente, los análisis indicaron que probablemente se trataba del mismo clon, como revela la coincidencia del patrón de bandas en los aislados 101, 102, 103, 106 y 107 (Figura 5). Por lo tanto, en realidad, sólo se detectaron dos cepas de *Salmonella* diferentes resistentes a C3G en 2018 y así la prevalencia resulta en 3,64% (IC del 95%: 1-12,3). De estos aislados, el 103 fue serotipado, y resultó ser la variante monofásica del serotipo Typhimurium (S. 4,12:i:-). El aislado 3, perteneciente a la otra explotación, perteneció al serotipo Rissen (6,7:f,g:-).

Calculando la prevalencia por rebaños, en el 2018 se detectaron 2 rebaños con presencia de cepas de *Salmonella* resistentes a C3G (11,76%; IC95%: 3,3-34,3). La prevalencia por rebaños del periodo 2008-2009 (un rebaño con resistencia a C3G) fue ligeramente inferior a la del 2018 (1,33%; IC95%: 0,2-7,1); ($p=0,0866$) (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia individual y por rebaño de aislados de *Salmonella* resistentes a cefalosporinas de tercera generación estimada mediante Fisher Exact Test.

Periodo	Aislados			Rebaños		
	Nº de analizados	Nº de aislados positivos a BLEE/AmpC (%)	<i>p</i>	Nº de analizados	Nº de aislados positivos a BLEE/AmpC (%)	<i>p</i>
2008 - 2009	270	1 (0,37)	0,0002	75	1 (1,33)	0,0866
2018	59	6 (10,17)		17	2 (11,76)	
	55	2 (3,64)	0,0799*			

p: significación (test exacto de Fisher). BLEE: betalactamasas de espectro extendido. *significación obtenida tras eliminar a aislados por pertenecer al mismo clon.

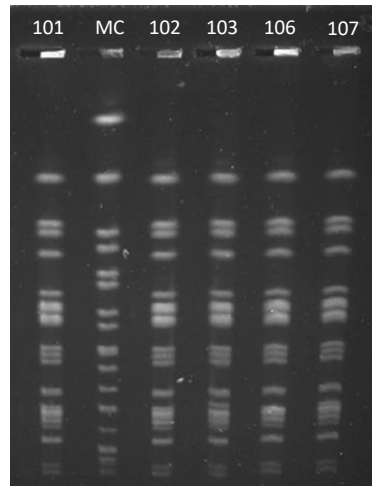


Figura 5. Determinación de la relación filogenética mediante la técnica PFGE de los aislados 101, 102, 103, 106 y 107, procedentes de la misma explotación. Los aislados están indicados en la parte superior del gel. El patrón de bandas estándar (*S. Braenderup*) está indicado como MC, utilizado como marcador de tamaño molecular. Se observa en todas las cepas el mismo patrón de 18 bandas, confirmándose así, que pertenecen al mismo clon.

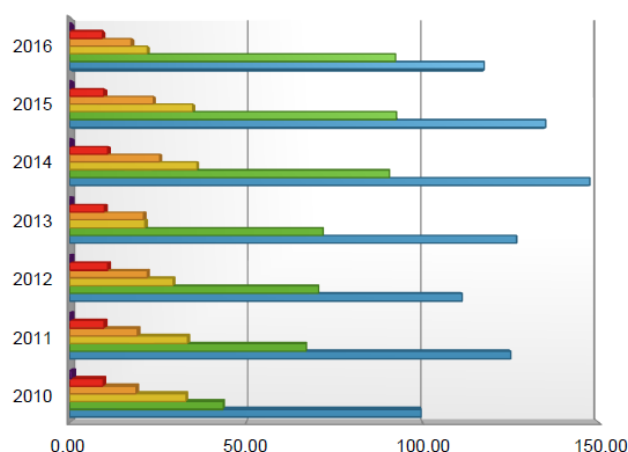
4.2. Caracterización genética de las cepas productoras de BLEE y AmpC

La producción de AmpC en la única cepa de *Salmonella* resistente a C3G aislada en el periodo 2008-2009 se asoció con la presencia del gen *bla*_{CMY-2}.

De las dos cepas de *Salmonella* resistentes a C3G del periodo 2018 se analizó el aislado 3 mediante secuenciación genética completa. Se identificó el gen *bla*_{TEM-1b} como el posible responsable de la producción de esta resistencia. Además, análisis bioinformáticos identificaron otros genes de resistencia frente a aminoglucósidos (*ant*(3'')-Ia y *aadA2*), fenicoles (*cmlA1* y *floR2*), trimetoprima (*dfrA1*), sulfonamidas (*sul1*) y tetraciclinas (*tetA4*).

5. DISCUSIÓN

La prevalencia de resistencia individual a C3G del 2008-2009 fue “muy baja (<1%)”, según los criterios de la EFSA [30] y se sitúa por debajo de la media europea (2,3%), aunque dentro del rango observado en Europa en el mismo periodo (0-3,8%) [63]. Esta baja prevalencia se podría explicar por la reciente introducción de estos antibióticos en el sector veterinario (ceftiofur) y por la administración vía parenteral (intramuscular o subcutánea), que permitía aplicar tratamientos individuales y puntuales, a diferencia de los tratamientos realizados vía oral a través del pienso o agua, que afectan a todos los individuos del rebaño (sanos y enfermos). Además, el uso de esta familia de antibióticos en animales de producción durante los años 2010-2016 en España era mucho menor (0,35mg/PCU) que la cantidad administrada de otras familias como la de las fluoroquinolonas (10mg/PCU) o las tetraciclinas (100mg/PCU) (Figura 6).



	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
 Cefalosporinas*	0,78	0,35	0,31	0,34	0,39	0,37	0,35
 Fluoroquinolonas	9,53	9,79	10,86	9,88	10,84	9,73	9,29
 Macrólidos	18,85	19,28	22,03	21,01	25,55	23,71	17,52
 Polimixinas	33,02	33,48	29,38	21,46	36,10	34,91	22,02
 Penicilinas	43,55	67,08	70,54	71,82	90,68	92,65	92,40
 Tetraciclinas	99,64	125,04	111,18	126,68	147,38	134,89	117,49

Figura 6. Consumo en mg/PCU de las diferentes familias de antibióticos más utilizados en veterinaria en España desde el 2010 al 2016 [43]. *Incluye las cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. PCU: Population Correction Unit.

Si comparamos la prevalencia del 2008-2009 con la de diez años después, observamos que la del 2018 (10,17%) es significativamente mayor ($p=0,00079$). Sin embargo, de los 6 aislados positivos, 5 procedían de la misma granja y todos ellos resultaron ser el mismo clon acorde con los ensayos de PFGE. Por tanto, la prevalencia real fue al menos de 3,64% (ya que no se analizó filogenéticamente el resto de aislamientos), clasificándose como “baja resistencia (1-10%)”

según la EFSA [30]. Aun así, esta seguía siendo algo superior a la del periodo 2008-2009 ($p=0,079$). La prevalencia de rebaños con cepas de *Salmonella* resistentes a C3G fue, así mismo, algo mayor en 2018 que en el periodo 2008-2009 (11,76% vs. 1,33%; $p=0,086$), sugiriendo una tendencia creciente, aunque igualmente no fue significativa, posiblemente por el escaso número de rebaños incluidos en la comparación. A pesar de que la diferencia entre las prevalencias de los dos periodos no sea significativa los datos son acorde con lo descrito en el resto de España, donde se observa una tendencia al incremento de resistencias [43], así como en otros países europeos como Alemania, donde se observó una tendencia creciente muy significativa de resistencia a C3G en cepas de *Salmonella* aisladas de carne de cerdo [26].

El análisis realizado sobre las cepas de 2018 reveló que poseían patrones de multirresistencia a antibióticos, apoyando la posible relación entre el mantenimiento de la resistencia a las C3G en animales con la presión co-selectiva por el uso excesivo de antibióticos no betalactámicos [19].

El aislado 464 presentó resistencia mediante la producción de enzimas AmpC, aparentemente codificada por el gen *bla_{CMY-2}*, betalactamasa más prevalente entre las cefalosporinas y más distribuida [4]. Este gen se detectó por primera vez en España en 1999 [54] y, aunque se suele asociar a elementos genéticos móviles [63], apenas se ha encontrado en enterobacterias de porcino en España. De hecho, es la primera vez que este gen es detectado en aislados *S. Bredeney* de porcino, mientras que ya se había detectado anteriormente en aislados *S. Bredeney* de la especie humana [22], y por tanto podrían difundirse mediante transmisión zoonótica a humanos de este tipo de genes de resistencia a C3G.

Los aislados resistentes a las C3G del 2018 pertenecían a serotipos frecuentes en porcino (*S. Rissen* y variante monofásica de *S. Typhimurium*). Ambas mostraron una resistencia por producción de enzimas BLEE, difiriendo con el mecanismo de resistencia del aislado 464 en el periodo 2008-2009. El aislado 3 contuvo el gen *bla_{TEM-1b}*, que se asocia en mayor medida a la resistencia frente a la ampicilina que a la producción de BLEE y generalmente está vinculado a un plásmido transferible [38]. Estudios previos han mostrado que la sobreexpresión de este gen podría estar detrás de la producción de BLEE en este aislado [23; 45]. El serotipo *S. Rissen* se considera emergente en cerdos y carne de cerdo y sigue causando brotes esporádicos en humanos [12], por lo que podría actuar como transmisor zoonótico de este gen. Este aislado contuvo otros genes de resistencia, entre los cuales cabe destacar el gen *tetA4*, que confiere resistencia frente a la tigeciclina, un derivado de las tetraciclinas que dio lugar a una nueva clase de antibióticos, las glicilciclinas, utilizadas como tratamiento de último recurso frente a salmonelas multirresistentes productoras de BLEE [13].

Respecto a la variante monofásica de *S. Typhimurium*, no se pudo realizar su caracterización genética, pero se detectó una propagación clonal de resistencia a C3G dentro de un rebaño. En los últimos años la variante monofásica de *S. Typhimurium* se ha posicionado como uno de los serotipos más frecuentes en cerdos de cebo [8] y una causa emergente de salmonelosis humana [26]. Este serotipo suele estar asociado a altos niveles de RA. Al igual que para *S. Rissen*, este serotipo mostró resistencia a C3G y también a la ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, sulfametoxazol, tetraciclina y tigeciclina. Considerando que este serotipo es uno de los principales asociados a las infecciones humanas, sería aconsejable la vigilancia de las resistencias en este serotipo comenzando por la determinación de los genes responsables de la producción de BLEEs del aislado.

6. CONCLUSIONES

De este estudio se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Las prevalencias de las resistencias a C3G observadas en ambos periodos son bajas, aunque mayor en las cepas aisladas en el 2018, lo cual sugiere que la resistencia contra estos antibióticos se ha incrementado con el tiempo.
2. Las cepas multirresistentes producían diferentes β -lactamasas, AmpC y BLEE en aislados de 2008-2009 y 2018, respectivamente, lo que sugeriría un origen variable de resistencias a C3G.
3. La mayoría de los aislados con producción de β -lactamasas mostraron un patrón de multirresistencia a antibióticos.
4. La presencia de genes de resistencia en serotipos con potencial zoonótico como *S. Bredeney* y la variante monofásica de *S. Typhimurium* podría suponer un riesgo de dispersión interespecífica de dichos genes.

6. CONCLUSIONS

The conclusions obtained from this study are the following:

1. The prevalence of C3G are low in strains isolates in 2008-2009 and 2018, but there is an increase in strains isolated in 2018.
2. This study identified the production of different β -lactamases, AmpC and ESBL in strains isolated in 2008-2009 and 2018, respectively, suggesting the variable origin of the C3G resistance.
3. β -lactamic resistance isolates showed an antibiotic multiresistance pattern.
4. The presence of resistance genes in serotypes with zoonotic potential such as *S. Rissen* and the monophasic variant of *S. Typhimurium* implies a risk of interspecific dispersion of these genes.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Comenzar agradeciendo al personal de departamento de Patología Animal de la Universidad, concretamente a los de la Unidad de Microbiología e Inmunología por darme la posibilidad de realizar un estudio experimental y enseñarme las técnicas y métodos necesarios para poder llevar a cabo el estudio. Sobre todo, agradece a mis tutores, Raúl C. Mainar Jaime y Jesús A. Arenas Busto que me han aconsejado durante todo el proceso de la elaboración de la memoria del trabajo.

La realización de este trabajo me ha servido para conocer nuevas técnicas laborales y cómo funciona un laboratorio de microbiología. He adquirido habilidades en cuestión de

organización de las tareas dentro de un laboratorio donde los tiempos forman una parte muy importante del proceso. Además, he aprendido cómo se distribuye y desarrolla un artículo científico, me he familiarizado con las revistas científicas del campo de la patología animal y he ampliado mis conocimientos sobre el género *Salmonella* y las resistencias frente a los antibióticos, concienciándome así, de la importancia que tiene el tema sobre la salud pública.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). (2018). Acceso el 30/06/2019 en https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/laAEMPS/2018/docs/NI-AEMPS_9-2018-Informe-Jiacra.pdf
2. Andrés-Barranco, S. (2016). *Salmonelosis porcina: diagnóstico microbiológico, papel de los animales silvestres y control mediante estrategias de alimentación* (tesis doctoral). Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
3. ANICE (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España). (2018). El sector cárnico español. Acceso el 28/09/2019 en https://www.anice.es/industrias/area-de-prensa/el-sector-carnico-espanol_213_1_ap.html
4. Arlet, G., Barrett, T.J., Butaye, P., Cloeckert, A., Mulvey, M.R. y White, D.G. (2006). *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect.*, 8:1945-1954.
5. Arnedo-Pena, A., Bellido-Blasco, J.B., Romeu-García, MA., Meseguer-Ferrer, M. (2017). Detección de brotes de toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella* Typhimurium. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 35:469-70.
6. Avguštin, J. (2012). Animal production systems as a selective environment for antibiotic resistance genes. *Acta Agric. Slov*, 100:7-17.
7. Blazquez, J., Oliver, A., y Gomez-Gomez, J.M. (2002). Mutation and evolution of antibiotic resistance: Antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Curr. Drug Targets*, 3:345-349.
8. Bonardi, S. (2017). *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol. Infect.*, 145:1513-1526.
9. Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:933-951.

10. Burow, E., Simoneit, C., Tenhagen, B.A. y Käsbohrer, A. (2014). Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* – A systematic review. *Prev. Vet. Med.*, 113:364-375.
11. Bush, K. y Jacoby, G.A. (2009). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:969-976.
12. Campos, J., Mourão, J., Peixe, L. y Antunes, P. (2019). Non-typhoidal *Salmonella* in the pig production chain: a comprehensive analysis of its impact on human health. *Pathog.*, 8:19.
13. Capoor, M.R., Nair, D., Posti, J., Singhal, S., Deb, M., Aggarwal, P. y Pillai, P. (2009). Minimum inhibitory concentration of carbapenems and tigercycline against *Salmonella* spp. *J. Med. Microbiol.*, 58:337-341.
14. Carmine, A. A., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M. y Avery, G. S. (1983). Cefotaxime. *Drugs*, 25:223-289.
15. Cervantes, H. (2006). Banning antibiotic growth promoters: learning from the European experience. *Poult. Int.*, 45:10-14.
16. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., and Hanage, W.P. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.*, 8:240–245.
17. Cox, J. (1999). *Salmonella*. En *Encyclopedia of Food Microbiology*, Robinson, R.K., C.A. Batt y P.D. Pates (ed.). Academic Press, London, 36:928-1937.
18. Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. y Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65:490–495.
19. Dandachi, I., Chabou, S., Daoud, Z. y Rolain, J.M. (2018). Prevalence and emergence of extended-spectrum cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant Gram-negative bacteria of animal origin in the Mediterranean basin. *Front. Microbiol.*, 9:2299.
20. Davies, J. y Davies, D. (2010). Origins and evolution antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74:417-433.
21. de Frutos, M., López-Urrutia, L., Berbel, C. Allue, M., Herrera, S., Manuel-Azcona, J., et al. (2018). Brote de *Salmonella* Typhimurium monofásica asociada al consumo de carne asada de cerdo. *Rev Esp Quimioter*, 31:156-159.
22. de Toro, M., García, P., Rodríguez, I., Rojo-Bezares, B., Helmuth, R., Sáenz, Y., Rodicio, M.R., Guerra, B. y Torres, C. (2013). Characterisation of plasmids implicated in the mobilisation of extended-spectrum and AmpC β -lactamase genes in clinical *Salmonella enterica* isolates and temporal stability of the resistance genotype. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 42:167-172.

23. Devanga Ragupathi, N.K., Muthuirulandi Sethuvel, D.P., Shankar, B. A., Munusamy, E., Anandan, S. y Veeraraghavan, B. (2016). Draft genome sequence of bla_{TEM-1}-mediated cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from bloodstream infection. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 7:11–12.
24. Draper, P. (1998). The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.*, 3:1253-1261.
25. Echeita, M.A., Herrera, S. y Simón, C. (2011). Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 29:55-60.
26. EFSA (European Food Safety Authority), and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J*, 2019, 17:5598.
27. EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA J*, 2010, 8:1826.
28. EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J*, 2011, 9:2322.
29. EFSA (European Food Safety Authority). (2012). Scientific opinion on an estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in turkeys. *EFSA Journal* 2012, 10:2616.
30. EFSA (European Food Safety Authority). (2017). ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA J*, 2017, 15:5017.
31. EFSA (European Food Safety Authority). (2018). The European Union summary report trend and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J*, 2018, 16:5500.
32. Ellermeier, C.D. y Slauich, J.M. (2006). The genus *Salmonella*. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY.
33. EMA (European Medicines Agency). (2011). Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries (2005-2009). (EMA/238630/2011).
34. EMA (European Medicines Agency). (2017). Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals – Categorisation of antimicrobials. (EMA/CVMP/CHMP/682198/2017). Acceso el 2/07/2019 en

https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/answer-request-european-commission-updating-scientific-advice-impact-public-health-animal-health-use_en.pdf

35. Endimiani, A., Perez, F. y Bonomo, R.A. (2008). Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. *Expert Rev. Anti-infective Ther.*, 6:805-824.

36. Esparza-Olcina, M.J. (v.2/2008). Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. Guía_ABE. Infecciones en pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea] [actualizado el 22/11/2008; consultado el 24/08/2019]. https://guia-abe.es/files/pdf/antibioticos_v2_2008.pdf

37. Farmer, JJ., Boatwright, HD., Janda, JM. (2007). *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification, p. 649-669. En PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, ML Landry y MA Tenover (ed.), *Man. Clin. Microbiol.*, 9th Ed. ASM Press, Washington, DC 2036-2904, USA.

38. García, V., Vázquez, X., Bances, M., Herrera-León, L., Herrera-León, S. y Rodicio, M. R. (2019). Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar enteritidis, genetic basis of antimicrobial drug resistance and plasmid diversity in ampicillin-resistant isolates. *Microb. Drug Resist.*, 25:219-226.

39. Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14:11-32.

40. Hall, B. G., y Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55:1050-1051.

41. Hölzel, C.S., Schwaiger, K., Harms, K., Küchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., Müller, C. y Bauer, J. (2010). Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environ. Res.*, 110:318-326.

42. JIACRA (Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis). (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report of the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA J*, 2017, 15:4872.

43. JIACRA (Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis), España. (2018). Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. Acceso el 8/07/2019 en http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0

44. Kietzmann, M., Markus, W., Chavez, J. y Bollwahn, W. (1995). Drug residues in untreated swine. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 102:441-442.

45. Lartigue, M.F., Leflon-Guibout, V., Poirel, L., Nordmann, P., Nicolas-Chanoine, M.H. (2002). Promoters *P3*, *Pa/Pb*, *P4*, and *P5* upstream from *bla*_{TEM} genes and their relationship to β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:4035-7.
46. Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Røttingen, J.A., Klugman, K. y Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*, 387:168-175.
47. MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2019). El sector porcino. <https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/>
48. MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentos y Medio Ambiente). (2019). Informe del consumo alimentario en España 2018. https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/20190807_informedeconsumo2018pdf_tcm30-512256.pdf
49. Marín, M. y Gudíol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21:42-55.
50. Martínez-Avilés, M., Garrido-Esteba, M., Álvarez, J. y de la Torre, A. (2019). *Salmonella* surveillance systems in swine and humans in Spain: a review. *Vet. Sci.*, 6:20.
51. Mølbak, K., Olsen, J.E., Wegener, H.C. (2016). *Salmonella* infections, p. 57-136. En H.P. Rieman and D.O. Cliver (eds.) Foodborne infections and intoxications. 3th edition. School of Veterinary Medicine, University of California, Davis. Academic press, Elsevier.
52. Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F. y Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 29:524-534.
53. Navarro, F., Miró, E. y Mirelis, B. (2002). Interpretive reading of the antibiogram of enterobacteria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 20:225-234.
54. Navarro, F., Perez-Trallero, E., Marimon, J.M., Aliaga, R., Gomariz, M y Mirelis, B. (2001). CMY-2 production *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999- December 2000). *J. Antimicrob. Chemother.*, 48:383-389.
55. Norman, A., Hansen, L.H. y Sorensen, S.J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 364:2275-2289.
56. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2019). La resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>
57. Oromí, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36:367-370.

58. Paterson, D.L., y Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18:657-686.
59. PRAN (Plan Nacional frente a la resistencia a los antibióticos). (2019-2021). Acceso el 1/07/2019 en http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/pran_2019-2021_0.pdf?file=1&type=node&id=497&force=0
60. PRAN (Plan Nacional frente a la resistencia a los antibióticos). (2016). Análisis integral de consumo de antibióticos y la aparición de resistencias a los antibióticos en bacterias de humanos y animales productores de alimentos. *Anaporc*, 13:128:22-28.
61. Ribot E.M., Fair M.A., Gautom R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B. y Barret, T.J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.*, 3:59-67.
62. Robinson, T.P., Bu, D.P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E.M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S.I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel, T.P. y Woolhouse, M.E.J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 110:377-380.
63. Seiffert, SN., Hilty, Markus, Perreten, V. y Endimiani, A. (2013). Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resist. Updat.*, 16:22-45.
64. Tavechio, A.T., Ghilardi, Â.C.R., Fernandes, S.A. (2004). "Multiplex PCR" identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in São Paulo State, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 46:115-117.
65. Toleman, M.A. y Walsh, T.R. (2011). Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35:912-935.
66. UE (Unión Europea). (2011). Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. Action plan against the rising threats from antimicrobial resistance. COM 748.
67. Vico, J.P., Rol, I., Garrido, V., San Román, B., Grilló, MJ. y Mainar-Jaime, R.C. (2011). Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities, and risk factor analysis. *J. Food Prot. K.*, 74:1070-1078.
68. Zhanel, G.G., Lawson, C.D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagacé-Wiens, P.R.S., Denisuik, A., Rubinstein, E., Gin, A.S., Hoban, D.J., Lynch, J.P. y Karlowsky, J.A. (2013). Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination. *Drugs*, 73:159-177.