



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

**Colibacilosis y monitorización
de antibiorresistencias en
producción cunícola**

Leticia Carballeira Campa

Grado en Veterinaria

Año 2023-2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Leticia Carballeira Campa y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional” Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Financiación

La parte experimental del presente Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el marco del proyecto de I+D+i / PID 2011-133041OB-100, financiado por MICIU/AEI/10.130139/501100011033/ y por FEDER “Una manera de hacer Europa”; junto con la ayuda ED431C 2021/11 de la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, (Xunta de Galicia) y FEDER.

La autora, Leticia Carballeira Campa agradece al Campus Terra su ayuda a la iniciación a la investigación 2023-2024, convocada por la *Resolución Reitoral 30 de maio 2023, da Universidade de Santiago de Compostela, pola que se establecen as bases reguladoras e se convocan bolsas para a iniciación a investigación no marco do Convenio de Colaboración entre a USC e a Consellería de Cultura, Educación, Formación Profesional e Universidades polo que se regula o Campus de Especialización Campus Terra.*



Índice

Licencia	1
Financiación	1
Índice	2
Resumen	3
Resumo	4
Abstract	5
Resumen gráfico	6
Índice de abreviaturas	7
1. Introducción	7
1.1. Producción cunícola.....	7
1.2. Patologías digestivas.....	8
1.3. Colibacilosis.....	10
1.4. Estructura poblacional de <i>E. coli</i>	12
1.5. Resistencia a los antibióticos (RAM).....	13
1.6. RAM en aislados de <i>E. coli</i> de origen cunícola.....	16
2. Objetivos	18
3. Material y métodos	19
3.1. Muestras y colección de <i>E. coli</i>	19
3.2. PCR convencional.....	19
3.3. Caracterización fenotípica.....	21
3.4. Caracterización genotípica.....	23
3.4.1. Secuenciación de fragmentos cortos tipo Sanger.....	25
3.4.2. Determinación de grupo filogenético.....	27
4. Resultados	28
4.1. Aislamientos EPEC.....	28
4.2. Caracterización fenotípica de antibiorresistencias por CMI.....	29
4.3. Caracterización genotípica de RAM.....	30
4.3.1. Secuenciación del gen <i>bla</i> _{CTX-M}	30
4.4. Caracterización filogenética de las cepas EPEC.....	31
5. Discusión	33
6. Conclusiones	36
7. Bibliografía	37

Resumen

Colibacilosis y monitorización de antibiorresistencias en producción cunícola

Las patologías digestivas constituyen la principal causa de mortalidad, retrasos en el crecimiento, y pérdidas económicas en producción cunícola. Entre todas, la colibacilosis es la de mayor prevalencia, causante de enteritis y diarrea, así como de elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en el período de destete, con graves pérdidas económicas para el sector. El carácter muchas veces plurietiológico, y la similitud de los signos clínicos dentro de estas patologías, junto con el incremento de bacterias multirresistentes (MDR), dificulta su diagnóstico y tratamiento. En la actualidad, la antibiorresistencia supone un desafío mundial que precisa de un abordaje *One Health*, comenzando por las granjas de producción animal, como reservorio potencial de bacterias MDR para el hombre y el medio ambiente.

En el presente trabajo se abordó la problemática del diagnóstico de la colibacilosis, la caracterización de las cepas de *E. coli* implicadas, y sus perfiles de antibiorresistencia (RAM), con el objeto de conocer la situación actual de esta enfermedad. Para ello, se analizaron 60 hisopos de contenido intestinal, tomados de manera individual de gazapos en período de cebo (30-60 días), durante los meses de agosto a octubre del 2023, procedentes de 10 explotaciones de 4 provincias españolas con problemas de diarreas. Las muestras se sembraron en MacConkey Lactosa, y mediante PCR se detectaron 29 (48,3%) confluentes positivos para cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). De esos confluentes, se consiguieron recuperar colonias *eae* positivas de 21 muestras. El estudio genotípico de resistencias, mostró que el 38,1% de las 21 cepas EPEC eran portadoras del gen plasmídico *mcr-1*, codificador de la resistencia a la colistina. Además, en una de las cepas EPEC (4,8%) se identificó el gen *bla_{CTX-M-9}*, codificador de una betalactamasa de espectro extendido (BLEE), capaz de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro. El estudio filogenético de la colección, mostró que todas las EPEC del estudio pertenecían al filogrupo B1. Por último, el ensayo de sensibilidad de las cepas mediante el método de concentración mínima inhibitoria (CMI), determinó que 19 de las 21 EPEC (90,5%) eran MDR, con las mayores prevalencias (>50%) frente a la tetraciclina, flumequine, enrofloxacino, trimetoprima/sulfametoxazol y neomicina. Concluimos que i) un diagnóstico específico de este patotipo, basado en la detección del gen *eae* codificador de la intimina, y el filogrupo, son clave para el control de la colibacilosis en cunicultura; ii) los niveles de MDR encontrados en las cepas EPEC de este estudio son muy elevados, lo que compromete el control terapéutico de esta patología; iii) dada la alta prevalencia del gen plasmídico *mcr-1*, es fundamental su monitorización, y evitar la transmisión de estas cepas a lo largo de la cadena de producción.

Palabras clave: antibiorresistencia (RAM), cunicultura, conejo, colibacilosis, *E. coli*, EPEC, betalactamasas de espectro extendido (BLEE), multirresistencia, *One Health*.

Resumo

Colibacilose e monitorización de antibiorresistencias en produción cunícola

As patoloxías dixestivas constitúen a principal causa de mortalidade, atrasos no crecemento, e perdas económicas en produción cunícola. Entre todas, a colibacilose é a de maior prevalencia, causante de enterite e diarrea, así como de elevadas taxas de mortalidade e morbilidade no período de destete, con graves perdas económicas para o sector. O carácter moitas veces plurietiolóxico, e a similitude dos signos clínicos dentro destas patoloxías, xunto co incremento de bacterias multirresistentes (MDR), dificulta o seu diagnóstico e tratamento. Na actualidade, a antibiorresistencia supón un desafío mundial que precisa dun abordaxe *One Health*, comezando polas granxas de produción animal, como reservorio potencial de bacterias MDR para o home e o medio ambiente.

No presente traballo abordouse a problemática do diagnóstico da colibacilosis, a caracterización das cepas de *E. coli* implicadas, e os seus perfís de antibiorresistencia (RAM), co obxecto de coñecer a situación actual desta enfermidade. Para iso, analizáronse 60 hisopos de contido intestinal, tomados de maneira individual de cazapos en período de cebo (30-60 días), durante os meses de agosto a outubro do 2023, procedentes de 10 explotacións de 4 provincias españolas con problemas de diarreas. As mostras sementáronse en MacConkey Lactosa, e mediante PCR detectáronse 29 (48,3%) confluente positivos para cepas de *Escherichia coli* enteropatóxica (EPEC). De esos confluente, conseguíronse recuperar colonias *eae* positivas de 21 mostras. O estudo xenotípico de resistencias, mostrou que o 38,1% das 21 cepas EPEC eran portadoras do xene plasmídico *mcr-1*, codificador da resistencia á colistina. Ademais, nunha das cepas EPEC (4,8%) identificouse o xene *bla_{CTX-M-9}*, codificador dunha betalactamasa de espectro estendido (BLEE), capaz de hidrolizar cefalosporinas de amplo espectro. O estudo filoxenético da colección, mostrou que todas as EPEC do estudo pertencían ao filogruppo B1. Por último, o ensaio de sensibilidade das cepas mediante o método de concentración mínima inhibitoria (CMI), determinou que 19 das 21 EPEC (90,5%) eran MDR, coas maiores prevalencias (>50%) fronte á tetraciclina, flumequine, enrofloxacino, trimetoprima/sulfametoxazol e neomicina. Concluímos que i) un diagnóstico específico deste patotipo, baseado na detección do xene *eae* codificador da intimina, e o filogruppo, son clave para o control da colibacilose en cunicultura; ii) os niveis de MDR atopados nas cepas EPEC deste estudo son moi elevados, o que compromete o control terapéutico desta patoloxía; iii) dada la alta prevalencia do xene plasmídico *mcr-1*, é fundamental a súa monitorización, e evitar a transmisión destas cepas ao longo da cadea de produción.

Palabras chave: antibiorresistencia (RAM), cunicultura, coello, colibacilose, *E. coli*, EPEC, betalactamasas de espectro estendido (BLEE), multirresistencia, *One Health*.

Abstract

Colibacillosis and monitoring of antimicrobial resistance in rabbit production

Digestive pathologies are the main cause of mortality, growth delays, and economic losses in rabbit production. Among all, colibacillosis is the most prevalent, causing enteritis and diarrhoea, as well as high mortality and morbidity rates in the weaning period, with serious economic losses for the sector. The often multi-etiological nature and similarity of the clinical signs within these pathologies, together with the increase in multidrug-resistant bacteria (MDR), make their diagnosis and treatment difficult. Antimicrobial resistance is currently a global challenge that requires a One Health approach, starting with animal farms, as a potential reservoir of MDR bacteria for humans and the environment.

In the present work, the problem of the diagnosis of colibacillosis, the characterization of the *E. coli* strains involved, and their antibiotic resistance profiles (AMR) were addressed, in order to know the current situation of this disease. To this end, 60 swabs of intestinal content were analyzed, taken individually from kittens in the fattening period (30-60 days), during the months of August to October 2023, from 10 farms in 4 Spanish provinces with diarrhea problems. The samples were planted in MacConkey Lactose, and 29 (48.3%) positive confluent colonies for enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains were detected by PCR. From these confluent colonies, positive *eae* colonies were recovered from 21 samples. The genotypic study of resistance showed that 38.1% of the 21 EPEC strains were carriers of the plasmid gene *mcr-1*, which encodes colistin resistance. In addition, in one of the EPEC strains (4.8%) the *bla*CTX-M-9 gene was identified, encoding an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), capable of hydrolyzing broad-spectrum cephalosporins. The phylogenetic study of the collection showed that all the EPECs in the study belonged to phylogroup B1. Finally, the strain susceptibility assay using the minimum inhibitory concentration (MIC) method determined that 19 of the 21 EPECs (90.5%) were MDR, with the highest prevalence (>50%) against tetracycline, flumequine, enrofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole and neomycin. We conclude that i) a specific diagnosis of this pathotype, based on the detection of the intimin-encoding *eae* gene, and the phylogroup, are key to the control of colibacillosis in rabbit farming; ii) the levels of MDR found in the EPEC strains in this study are very high, which compromises the therapeutic control of this pathology; iii) Given the high prevalence of the plasmid gene MCR-1, it is essential to monitor it, and to avoid the transmission of these strains throughout the production chain.

Key words: antibioresistance (AMR), rabbit, colibacillosis, *E. coli*, EPEC, Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL), MDR, One Health.

Resumen gráfico

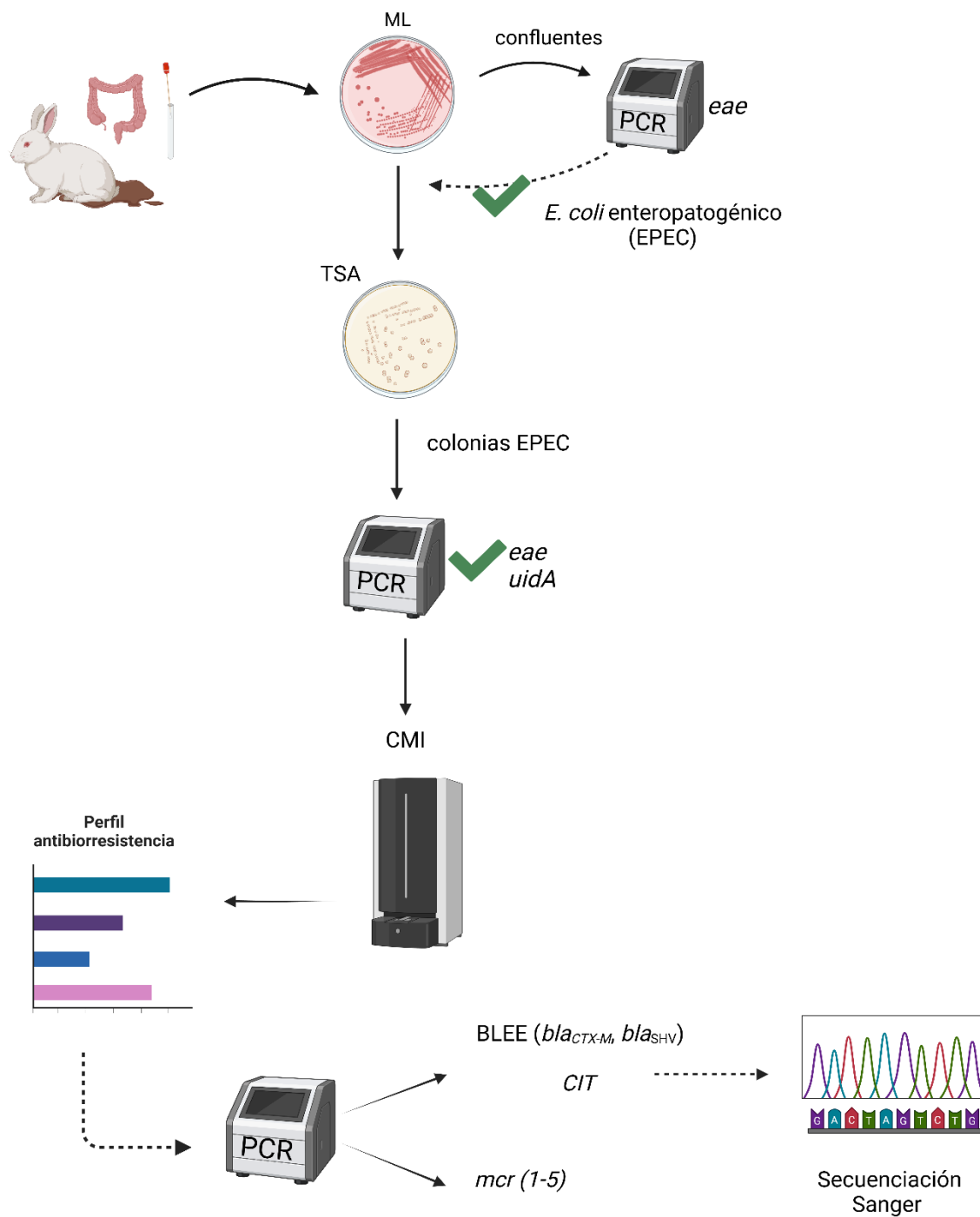


Figura 1. Resumen gráfico de “Colibacilosis y monitorización de antibiorresistencias en producción cunícola”. (Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com))

Índice de abreviaturas

- ADESCU:** Asociación Española de Cunicultura
- BLEE:** Betalactamasa de Espectro Extendido
- CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria
- DEC:** *Escherichia coli* diarreagénico
- DAEC:** *Escherichia coli* con adherencia difusa
- EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativo
- ECOFF:** *Epidemiological cut-off value*
- EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágico
- EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasivo
- EPEC:** *Escherichia coli* enteropatogénico
- ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigénico
- EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- LASAPAGA:** Laboratorio de Sanidade y Producción Animal de Galicia
- LREC:** Laboratorio de referencia de *E. coli*
- MDR:** *Multidrug Resistance*
- NGS:** *Next Generation Sequencing*
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction*
- PRAN:** Plan Nacional de Resistencias Antibióticos
- RAM:** Resistencia a Antimicrobianos
- VTEC:** *Escherichia coli* verotoxigénico
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- OMSA:** Organización Mundial de la Salud Animal

1. Introducción

1.1. Producción cunícola

Los orígenes del sector cunícola se sitúan en 1980 cuando se popularizó la cría intensiva de conejo, dando lugar a la industria altamente especializada que actualmente conocemos. La Unión Europea (UE) es el segundo productor mundial de carne de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) después de China. Dentro de los países que integran la UE, la mayor producción se concentra en España, Italia y Francia. De estos, España es el principal país exportador, con una producción total de carne de conejo de 36.957 toneladas/año en 2023, la cual ha disminuído un 9,7% con respecto al año anterior. A nivel nacional, durante el año 2022, las comunidades autónomas donde se concentró la mayor parte de la producción de conejo fueron: Castilla y León (21,3%), Cataluña (18,7%) y Castilla La Mancha (6,8%). A enero del año 2024 el censo de explotaciones cunícolas era de 3.318 explotaciones, de las cuales 1.198 tienen realmente carácter productivo, observándose una reducción del 18% en el número de explotaciones respecto al año 2022. La comunidad autónoma con más granjas de producción de gazapos de pequeño tamaño (menos de 400 madres) es Cataluña, seguida de otras comunidades, con granjas de mayor tamaño (más de 800 madres), como Valencia, Castilla y León o Galicia [1,2,3].

El ciclo productivo del conejo para la obtención de carne presenta variaciones en función de las razas de conejo, el modelo de producción (intensivo, semi-intensivo, o extensivo) y la localización geográfica, entre otras. En España la producción de carne de conejo en intensivo se realiza tal como se explica brevemente a continuación: las madres son inseminadas al día siguiente del parto, y tienen una gestación de 30 días; los gazapos en lactación se destetan en torno al día 28 de vida con un peso aproximado de 550-770 g, momento en el que pasan al local de cebo, donde estarán hasta ser enviados a matadero a los 70 días de vida con un peso vivo aproximado de 1,75- 2,25 kg. La carne de conejo es de consumo minoritario a nivel nacional, con un consumo per cápita en el año 2022 de 0,75 kg, a pesar de ser un producto con altas características nutritivas. Esta situación, se podría atribuir a la falta de consumo habitual, al encarecimiento de la carne debido a los altos costes de producción, a la presentación en canal entera que no atrae al consumidor, y sobre todo por la consideración de esta especie como animal de compañía. Su consumo cada vez es más reducido, como muestran los últimos indicadores recogidos por la Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, en los que se muestra una reducción de consumo del 13,8% en el año 2023 respecto al año 2022, por ello la industria ha comenzado a impulsar el sector con campañas de marketing, que recuerdan los beneficios nutricionales y promocionan una producción más sostenible [2,3,5].

Actualmente el sector se enfrenta a un período crítico, no solo por debilidades estructurales del sistema de producción, sino también por cuestiones relativas al bienestar animal

y a la aprobación de la nueva legislación referente al uso de antibióticos. Respecto a esta última, se ha aprobado el Reglamento CE 1831/2023, que establece restricciones en el uso de antibióticos como profilácticos, que viene a complementar el Reglamento 2019/16, relacionado con la reducción de los antibióticos en el ámbito veterinario. A esta legislación se añaden las medidas recogidas por el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN), entre las que se encuentra la realización de un diagnóstico microbiológico previamente a la administración de antibióticos, con la finalidad de reducir el impacto de los residuos liberados al medioambiente, así como las resistencias antibióticas asociadas al consumo de carne que llegan a través de la cadena alimentaria a nuestros hogares. Dentro del PRAN, los distintos sectores de producción animal presentan un programa REDUCE específico para cada especie. Todas estas medidas han conseguido que el sector cunícola, haya reducido un 45% el uso de antibióticos en el año 2019 respecto al año 2016, y también que haya disminuido en un 95% el consumo de colistina, según el último informe publicado entre el año 2020-2021. Actualmente el sector cunícola está inmerso en el plan REDUCE que comenzó en el año 2021, y que terminará en 2024, con el que se espera reducir todavía más el uso de antibióticos en el sector. Adicionalmente, para mejorar estos datos se ha realizado un acuerdo entre asociaciones nacionales de veterinarios y profesionales del sector, denominado ARAC, con diversos objetivos como: fomentar el uso racional de antibióticos y reducir su consumo un 30% en un período de dos años, plantear planes sanitarios preventivos alternativos a los profilácticos, sensibilizar a la población de la situación de la producción cunícola, y seguir las buenas prácticas establecidas para maternidades y peridestete, así como en el uso de piensos de retirada, colistina y oxitetraciclina. A pesar de las posibles tendencias emergentes que puedan surgir, la falta de alternativas a los alimentos medicados con antimicrobianos está causando grandes pérdidas económicas, al dificultar el control de altas tasas de mortalidad causadas por problemas digestivos en gazapos al destete [1,4,7].

1.2. Patologías digestivas

En las granjas de producción existen problemas sanitarios muy variados, destacando las patologías digestivas que tienen la mayor prevalencia en cunicultura y afectan sobre todo a los gazapos al destete, provocando elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en las explotaciones. A estas le siguen las patologías respiratorias, que afectan tanto a gazapos como a conejos adultos, siendo la enfermedad más habitual la pasteurelosis, causada por la bacteria *Pasteurella multocida*. Por último, están las patologías reproductivas que afectan sobre todo a hembras adultas. La mayoría de las enfermedades digestivas son infecciones mixtas y multifactoriales, asociadas a factores de riesgo como el ambiente, la alimentación inadecuada, la higiene, e incluso factores endógenos del propio animal, como puede ser la edad o la genética. La sintomatología que presentan las patologías digestivas es muy similar, cursando con anorexia, deshidratación, apatía,

letargo y diarrea, lo que dificulta su diagnóstico. El tratamiento antimicrobiano, al igual que en el sector porcino, es la primera opción para controlar las altas tasas de mortalidad en las crías al destete, pero la nueva legislación limita estos tratamientos y cada vez es más habitual el uso de autovacunas [1,29].

A continuación se explican brevemente algunas de las patologías digestivas que presentan mayor incidencia en este sector. En primer lugar, hay que mencionar **la enteropatía epizootica del conejo (EEC)**, de etiología desconocida, que consiste en un síndrome gastroentérico que afecta tanto a gazapos a partir de los 12 días de edad como a conejos adultos. Entre los signos clínicos destaca el rechinar de dientes y heces con moco gelatinoso. En segundo lugar se encuentra **la colibacilosis**, producida por cepas enteropatógenas de la bacteria *Escherichia coli*, en la cual se centra este trabajo, y se profundizará en esta enfermedad en el siguiente apartado. En tercer lugar **la clostridiosis**, enfermedad infecciosa causada por algunas especies de *Clostridium* spp. y sus toxinas, siendo una de las más conocidas la enterotoxemia iota que afecta principalmente a gazapos de 3-6 semanas. Está causada por *C. spiriforme*, un bacilo Gram positivo esporulado que se encuentra en la microbiota normal de los conejos, capaz de producir una disbiosis intestinal ante ciertos factores predisponentes como, por ejemplo, el abuso de antibióticos. También son frecuentes los casos de **enfermedad de Tyzzer**, causada por la bacterias *C. piliforme*, y **la enteropatía proliferativa** causada por *Lawsonia intracellularis*. Con menor prevalencia, aunque con un incremento en el número de casos se encuentra **la salmonelosis**, principalmente producida por *Salmonella enterica* serovar Typhymurium y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, que causa desde diarreas sanguinolentas a septicemias en gazapos, pero que afecta principalmente a hembras reproductoras, provocándoles abortos en el día 23 de gestación. Las patologías digestivas también pueden estar causadas por agentes parasitarios destacando **la coccidiosis** y **la criptosporidiosis**. En cuanto a las coccidiosis, está ocasionada por protozoos del género *Eimeria* que afectan principalmente a gazapos lactantes y destetados; la patogenia y las lesiones varían según la especie de *Eimeria*, siendo las más patógenas *E. intestinales* y *E. flavescens*. Además, dentro de este género se encuentra la especie *E. stiedai* que cursa con una presentación hepática de la enfermedad. Por otro lado, la criptosporidiosis, es una enfermedad causada por el protozoo *Cryptosporidium parvum*, parásito oportunista que causa una infección autolimitante sobre todo en conejos adultos inmunodeprimidos. Por último, mencionar que existen patologías digestivas causadas por **agentes víricos**, principalmente por rotavirus, Coronavirus y Parvovirus, que son poco frecuentes en los conejos, pero pueden causar mortalidad al coinfectar conjuntamente con otro agente el tracto gastrointestinal del conejo [30,31].

La principal vía de transmisión de estas patologías es la vía orofecal, sobre todo entre gazapos de la misma jaula, relacionado con su peculiar fisiología, ya que los conejos son roedores herbívoros monogástricos que cuentan con un sistema digestivo poco especializado para digerir la fibra vegetal. Esto los ha llevado evolutivamente a desarrollar el intestino grueso, donde el ciego alberga el 49% de la capacidad de digestión, y a practicar la cecotrofia, que implica que el alimento pase dos veces por el sistema digestivo con el fin de aprovechar al máximo los nutrientes. La cecotrofia hace que el conejo produzca dos tipos de heces: duras y blandas. Las heces duras están constituidas por elementos groseros de las fibras vegetales que no son aprovechables, y por tanto se excretan sin ser consumidas posteriormente. En cambio, las heces blandas, denominadas cecotrofos, están compuestas por sustancias solubles, microorganismos y partículas finas, siendo ricas en aminoácidos, vitaminas del grupo B y material biológico. Los cecotrofos se forman al revertir el contenido no excretado al ciego, a través de la válvula ileo-cecal por movimientos antiperistálticos del cólon generados al excretar las heces duras. Los cecotrofos fermentan en el ciego y pasan al colon distal, donde son recubiertos por una capa de mucina, y posteriormente estos son ingeridos por el conejo directamente desde el ano [8].

1.3. Colibacilosis

La colibacilosis es un síndrome intestinal causado por bacterias *E. coli* enteropatógenicas. Estas enteritis se detectan principalmente en gazapos lactantes, de 7 a 12 días de edad, y en gazapos recién destetados, de 4 a 6 semanas de edad. En conejos adultos, *E. coli* se encuentra coinfectando el tracto gastrointestinal junto con otros agentes, ya que cuanto mayor edad tienen los conejos mayor complejidad adquieren las enfermedades digestivas. Este agente perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* se trata de una bacteria Gram negativa, mesófila, anaerobia facultativa, no esporulante y colonizadora comensal de la microbiota gastrointestinal, con mayor presencia en el intestino grueso de animales de sangre caliente, por lo que no todas las cepas aisladas de contenido gastrointestinal son patógenas. En cuanto a sus características bioquímicas, es una bacteria comúnmente fermentadora de lactosa y ureasa negativa que crece a una actividad del agua de 0,95 y a una temperatura óptima de 37 °C. Esta bacteria se elimina al exterior a través de las heces, y puede sobrevivir cierto tiempo en agua y alimentos, pudiendo causar graves infecciones alimentarias. La transmisión a los humanos es fundamentalmente a través de alimentos contaminados como productos cárnicos, carne poco cocinada, leche cruda, hortalizas contaminadas con heces de animales, y en menor medida también se puede transmitir de persona a persona. Además es un gran indicador de contaminación fecal reciente. En conejos sanos, *E. coli* es una bacteria que se encuentra normalmente en bajas proporciones, por lo que si en un cultivo de heces de conejo sano se encuentra un crecimiento confluyente de *E. coli*, es un indicador de alteración o disbiosis intestinal [29,30].

Desde el punto de vista de su patogenicidad, las cepas de la especie *E. coli* se dividen en:

- Cepas comensales, que forman parte de la microbiota intestinal normal.
- Cepas patógenas extraintestinales (ExPEC), aquellas que causan infección fuera del tracto gastrointestinal.
- Cepas patógenas intestinales, también denominadas *E. coli* diarreogénicas (DEC).

Dentro de las cepas DEC, se describen 7 categorías: *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* verotoxigénico (VTEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* difusoadherente (DAEC) y *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). Cada una de estas categorías se caracteriza por una serie de mecanismos de virulencia específicos, así como diferente comportamiento dependiendo del hospedador [14].

En 1977, Cantey y Blake determinaron que las cepas EPEC de conejos presentaban un mecanismo de patogenicidad diferente, al no producir enterotoxinas a diferencia de los ETEC K88+ y K99+ que afectan a terneros y a lechones [15]. Las cepas EPEC en conejos no son enteroinvasivas, si no que se adhieren intimamente a la pared de los enterocitos, inyectando al interior de la célula hospedadora una serie de proteínas efectoras (Esp) que se encuentran codificadas en el cromosoma de EPEC, dentro de la isla de patogenicidad conocida como el locus del barrido del enterocito (LEE: *locus of enterocyte effacement*), que a su vez codifica el sistema de secreción Tipo III y los chaperones. El mecanismo de acción consiste primero en la adherencia de las bacterias a las microvellosidades mediada por pilis denominados BFP (*bundle-forming-pilis*) codificados principalmente en el plásmido EAF (*EPEC adherence factor*). Posteriormente se produce una transducción de señales codificadas por la isla de patogenicidad LEE que codifica para la formación de la intimina en la parte externa de la membrana. Por último se une el receptor de la intimina translocada (Tir), el cual se inserta en la membrana epitelial, con dos proteínas secretadas por la membrana que actúan como receptoras de la intimina. La intimina está codificada por el gen cromosomal *eaeA*, codificado por la isla de patogenicidad LEE, que induce unas lesiones características en las células intestinales, denominadas de adhesión y barrido (*attaching & effacing A/E*), al mismo tiempo que estimula la respuesta inmune de la mucosa (T_{H1}) y la hiperplasia de la cripta intestinal. Esto daña las vellosidades intestinales, elimina las microvellosidades y causa muerte celular, generando el reordenamiento del citoesqueleto y la acumulación de actina polimerizada junto con otras enzimas, que forman una estructura en forma de pedestal bajo los sitios de fijación bacteriana. Todo ello genera un acúmulo de solutos en el lumen intestinal que conduce al desarrollo de un síndrome de malabsorción en los gazapos, con la consiguiente diarrea acuosa. Como la intimina está codificada por el gen *eaeA*, este se emplea como diana de patogenicidad en el diagnóstico de colibacilosis para la detección de cepas EPEC, mediante la reacción en cadena polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) [16,17].

Los primeros signos de la colibacilosis aparecen a los 5-14 días post-destete, cursando principalmente con diarreas acuosas, mucoides e incluso sanguinolentas asociadas a los tramos distales de intestino delgado, ciego y colon. Además, es frecuente la presencia de signos clínicos como anorexia, dilatación abdominal, deshidratación y letargia, aunque si las cepas son de patogenicidad moderada, los signos clínicos no son muy evidentes, detectándose principalmente un empeoramiento en los índices productivos. En brotes de colibacilosis, es común observar en los nidales, gazapos con dilatación abdominal y la zona perianal sucia, mientras que en gazapos de engorde, a pesar de que los conejos suelen encontrarse sucios, lo más frecuente es la aparición de altos picos de mortalidad. El cuadro clínico de la colibacilosis puede empeorar si se produce un sobrecrecimiento de las cepas comensales de *E. coli* en el tracto digestivo, ya que genera un desequilibrio de la microbiota normal, conocido como disbiosis intestinal. Entre los factores asociados a las colibacilosis se encuentran: condiciones ambientales e higiénicas inadecuadas, ingesta de calostro insuficiente que hace que el gazapo reciba una menor cantidad de inmunoglobulinas A, y la escasa presencia de *E. coli* en conejos destetados, por la acción inhibitoria que ejercen los ácidos grasos volátiles y el pH inferior a 6,5 del ciego [18,19].

1.4. Estructura poblacional de *E. coli*

El tipado de *E. coli* fue propuesto por primera vez por Kauffman en 1947 [20], y desarrollado posteriormente por Ørskov y Ørskov en 1984 [21], en base a la técnica serotipado, que permite la diferenciación de cepas *E. coli* en función de los antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H) de la bacteria. Posteriormente con la llegada de las técnicas moleculares se empleó la electroforesis para diferenciar cepas de *E. coli* en base a su movilidad electroforética. Todas estas metodologías postularon que *E. coli* se componía de clones de individuos prácticamente idénticos con escasos fenómenos de recombinación, pero los análisis de genomas completos se demostró la importancia de la recombinación en la evolución genética de *E. coli* [22]. A finales de los 90, surge la técnica electroforesis enzimática de tipado de secuencias multiloci (MLST) [23], que proporciona información de las secuencias pertenecientes a fragmentos de genes *housekeeping* (genes constitutivos) en muchos loci, de manera que cuando se producen cambios en una sola base del locus se constituye un alelo diferente, generando una combinación única que origina una secuencia tipo (ST) y permite identificar distintas poblaciones dentro de una misma especie. En el año 2013, con una colección importante de cepas secuenciadas Clermont y col. [24] desarrollaron una técnica de PCR-multiplex que detecta alelos, y redefinieron la estructura poblacional de *E. coli* en 7 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F) y en cepas genéticamente distantes denominadas clados crípticos (I, II, III, IV y V). Actualmente, Clermont y col. [25] han definido un nuevo grupo filogenético G, situado entre el grupo B2 y el grupo F, contando así *E. coli* con 8 filogrupos específicos.

La filogenia permite ver asociaciones de las cepas de *E. coli* con las especies hospedadoras o con los nichos ecológicos. Por ejemplo, el filogrupo A y el filogrupo B2, se identifica en cepas de *E. coli* de origen en humano y en animales mamíferos; el grupo B1 predomina en cepas aisladas de conejos, así como en vertebrados ectodermos y peces, según un estudio realizado por Gordon y Cowling en Australia; el filogrupo D se puede encontrar más frecuentemente en origen aviar; mientras que el filogrupo E presenta un mayor rango de hospedadores, identificándose en cepas procedentes tanto de aves como de mamíferos [26,27,28].

1.5. Resistencia a los antibióticos (RAM)

Los antibióticos se llevan empleando, durante décadas, de manera rutinaria en la cría intensiva de animales de producción, para mantenerlos sanos y aumentar su productividad. Estos se venían administrando en cunicultura con tres finalidades: la metafilaxia, que consiste en administrar medicamentos a un grupo de animales para prevenir una enfermedad; la profilaxia, que consiste en la administración masiva de un medicamento a animales sanos por riesgo a contraer la enfermedad; y como promotores del crecimiento, para aumentar la eficiencia alimentaria. En los últimos años estas acciones se han visto mermadas por cambios legislativos, como se muestra a continuación. Actualmente, la metafilaxia se encuentra regulada por el Real Decreto 666/2023, que establece que el antibiótico empleado debe de ser prescrito por el veterinario clínico o de explotación y solo se puede administrar tras un diagnóstico de enfermedad infecciosa, limitándose su administración en el tiempo [29]. Adicionalmente, el Reglamento delegado (UE) 2024/1159, aclara que en el caso de que un antibiótico sea administrado vía oral por el responsable de los animales, este debe de garantizar el consumo individual del medicamento, o controlar eficazmente la ingesta por cada animal en un pequeño grupo [30]. La profilaxis actualmente está prohibida como uso rutinario, salvo condiciones excepcionales, según muestra el Real Decreto 666/2023, y los promotores del crecimiento llevan prohibidos totalmente desde el 2006 en la UE y así continúan en la actualidad, como muestra el Reglamento (UE) 2019/6, completado con Reglamento delegado (UE) 2023/905 [6,31].

El uso indiscriminado de antibióticos ha propiciado una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas, que no solo han desarrollado resistencias a diferentes familias de antibióticos, si no que también han contribuido a la propagación de genes que codifican para factores de resistencia y virulencia, surgiendo bacterias resistentes y multirresistentes. Hoy en día, la salud pública se está enfrentando a una peligrosa amenaza, ya que estos genes se transfieren de los animales a los humanos, o de ambos al medioambiente por medio de los residuos medicamentosos. En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la

Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), adoptaron un plan para controlar dichas resistencias a través de un enfoque *One Health*. Este enfoque tiene como objetivo reducir el uso indiscriminado de antibióticos en animales de abasto, y restringir el uso de aquellos que tienen importancia en medicina humana, solo a situaciones en las que estrictamente sean necesarios, al ser la industria de producción animal una fuente crucial en la aparición y transmisión de resistencias. Además, este mismo año la OMS ha actualizado la lista de patógenos bacterianos críticos, donde se han incluido 24 nuevos patógenos, abarcando resistencias a 15 familias antibióticas, siendo gran parte, bacterias Gram negativas. En esta lista se ha incluido la bacteria *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* por presentar cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas con resistencias frente a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos [32,33].

Las BLEE, son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico de amplio espectro y por tanto, confieren resistencia frente a antibióticos de la familia de los betalactámicos como son las penicilinas, las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y el aztreonam, pero no así a las cefamicinas ni a los carbapenémicos, por presentar diferencias en su composición química. Las betalactamasas, se dividen siguiendo el sistema Ambler, en cuatro clases diferentes en función de la secuencia de aminoácidos, y a su vez, cada una de las clases presenta familias portadoras de genes de resistencia. La clase A, incluye a las familias TEM, SHV, CTX-M; la clase C, porta las familias CMY, DHA y ACT; y la clase D, cuenta con la familia de genes OXA y AmpC. Estas tres clases están compuestas por serina en su zona activa que hidroliza los antibióticos betalactámicos. A diferencia de las clases anteriormente citadas, la clase B, emplea iones de zinc para atacar el anillo, denominándose la enzima, metalo- β -lactamasa. Estas enzimas es común encontrarlas en los animales y en su entorno, de ahí la preocupación por el aumento de las resistencias a las cefalosporinas en los últimos años. El genotipo más común de BLEE es la familia CTX-M, un grupo heterogéneo de enzimas que posiblemente deriven de la reubicación de genes cromosómicos de la bacteria *Kluyvera cryocrescens* a elementos genéticos móviles transmisibles, importantes portadores de resistencias a múltiples fármacos como, por ejemplo, las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftazidima) [34,35]. Dentro de la familia de CTX-M hay dos grupos con elevada prevalencia en animales de producción en España, el grupo 1 que predomina en porcino y el grupo 9, predominante en cunicultura [36]. Según el estudio realizado por García y col. el gen *bla*_{CTX-M-9} parece ser transmitido bien por plásmidos que pueden evolucionar y recombinarse, o bien por elementos móviles que los sitúan en una localización cromosómica [37].

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) publica cada año datos sobre el consumo de antimicrobianos en el ámbito veterinario, como por ejemplo, las tendencias de venta de antibióticos o su uso en animales. En 2020, con el fin de controlar el impacto de los antibióticos en la sanidad pública y animal, la EMA publicó unas pautas para manejo veterinario, donde clarifica qué antibióticos se pueden o no utilizar en animales de producción, para prevenir y controlar las antibiorresistencias [38]. Esta categorización ha sido realizada teniendo en cuenta varios criterios basados en evidencias y consideraciones de expertos, para establecer un ranking racional de cuatro categorías, que van desde la A-D, como se muestra en la Figura 2:

- Categoría A, incluye antibióticos no autorizados para uso veterinario, pero si para uso humano en la UE. Estos antibióticos se pueden utilizar en animales solo en casos excepcionales, donde ningún tratamiento de las categorías inferiores sea efectivo.
- Categoría B, incluye antibióticos de uso restringido, con el objetivo de mitigar el riesgo para la salud humana. Estos antibióticos se pueden utilizar en animales, donde ningún tratamiento de las categorías inferiores sea efectivo.
- Categoría C, incluye antibióticos que presentan múltiples alternativas en medicina humana, pero pocas en medicina veterinaria, por lo que sólo deben de usarse cuando no haya opciones efectivas en la categoría D.
- Categoría D, incluye los antibióticos que presentan el menor riesgo de propagar resistencias para la salud pública, por lo que se usaran en primera línea siempre que sea posible, evitando su uso innecesario en tratamientos largos y/o grupales.

Como se ha mencionado anteriormente, los animales de producción son los principales reservorios de patógenos que se transmiten a los humanos a través de la cadena alimentaria, por medio del contacto directo con excreciones, o a través de fómites. Un ejemplo de bacteria con capacidad de causar infecciones graves tanto en humanos como en animales, es *E. coli*, y de actuar como donante y receptor de genes de resistencia, siendo cada vez más limitadas las opciones de tratamiento frente a las enterobacterias, por el aumento exponencial de cepas multirresistentes.

A	Aminopenicilinas mecilinam pivmecilinam	Carbapenemes meropenem doripenem	Fármacos utilizados exclusivamente para tratar la tuberculosis u otras enfermedades micobacterianas. isoniazida etambutol pirazinamida etionamida	Glucopéptidos vancomicina	EVITAR
	Ketólidos telitromicina	Lipopéptidos daptomicina		Gliciliclinas tigeciclina	
	Monobactámicos aztreonam	Oxazolidinonas linezolid		Derivados del ácido fosfónico fosfomicina	
	Rifamicinas (excepto rifamicina) rifampicina	Riminofenazinas clofazimina		Ácidos pseudomónicos mupirocina	
	Carboxipenicilina y ureidopenicilina, incluidas las combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas. piperacilina-tazobactam	Sulfonas dapsona		Sustancias nuevas autorizadas para medicina humana tras la publicación de la clasificación del AMEG. por determinar	
	Estreptograminas pristinamicina virginamicina	Otras cefalosporinas y penemes (Código ATC J01DI), incluidas las combinaciones de cefalosporinas de 3ª generación con inhibidores de las beta-lactamasas. ceftobiprol ceftarolina ceftolozano-tazobactam faropenem			
B	Cefalosporinas, de 3ª y 4ª generación, excepto las combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas cefoperazona cefovecina cefquinoma ceftiofur	Polimixinas colistina polimixina B	Quinolonas: fluoroquinolonas y otras quinolonas cinoxacino danofloxacino difloxacino enrofloxacino flumequina ibafloxacino	marbofloxacino norfloxacino orbifloxacino ácido oxolinico pradofloxacino	LIMITAR
C	Aminoglicósidos (excepto espectinomina) amikacina apramicina dihidroestreptomicina frameticina gentamicina kanamicina neomicina paromomicina estreptomicina tobramicina	Aminopenicilinas, en combinación con inhibidores de la beta-lactamasas amoxicilina+ácido clavulánico ampicilina + sulbactam	Anfenicóles cloranfenicol florfenicol tianfenicol	Macrólidos eritromicina qamitromicina oleandomicina espiramicina tildipirosina tilmicosina tulatromicina tilosina tivalosina	PRECAUCIÓN
		Cefalosporinas, de 1ª y 2ª generación, y cefamicinas cefacetrilo cefadroxilo cefalexina cefalotio cefalotina cefapirina cefazolina	Lincosamidas clindamicina lincomicina prilimicina		
			Pleuromutilinas tiamulina valnemulina		
D	Aminopenicilinas, sin inhibidores de la beta-lactamasas amoxicilina ampicilina metampicilina	Aminoglicósidos, espectinomina en monoterapia espectinomina	Sulfonamidas, inhibidores de la dihidrofolato reductasa y combinaciones formosulfatiazol ftalilsulfatiazol sulfacetamida sulfaclopiridazina sulfaclozina sulfadiazina sulfadimetoxina sulfadimidina sulfadoxina sulfafurazol sulfauanidina		CAUTELA
	Tetraciclinas clortetraciclina doxiciclina oxitetraciclina tetraciclina	Penicilinas antiestafilocócicas (penicilinas resistentes a beta-lactamasas) cloxacilina dicloxacilina nafcilina oxacilina	Sulfaleno sulfamerazina sulfametazol sulfametoxazol sulfamexopiridazina sulfamonometoxina sulfanilamida sulfapiridina sulfiquinoxalina sulfatiazol trimetoprima		
	Penicilinas naturales de espectro reducido (penicilinas sensibles a beta-lactamasas) bencilpenicilina benzatina fenoximetilpenicilina benzatina bencilpenicilina penetamato hidrioduro	Feneticilina fenoximetilpenicilina bencilpenicilina procaína	Polipéptidos cíclicos bacitracina	Nitroimidazoles metronidazol	
		Esteroides antibacterianos ácido fusídico	Derivados de nitrofurano furaltadona furazolidona		

Figura 2. Clasificación según la EMA de las categorías de antibiótico para uso veterinario. Tomada de [38].

1.6. RAM en aislados de *E. coli* de origen cunícola

Son pocos los estudios publicados hasta la fecha sobre la RAM y las cepas de *E. coli* patógenas en conejos de producción. Investigaciones realizadas en 2018, muestran nuevas resistencias y genes asociados con *E. coli* en conejos, como el estudio realizado en China, en el cual Xiaonan Zhao y col., tomaron 60 muestras fecales de conejos con diarrea, de las que aislaron 55 cepas de *E. coli* con alta resistencia a tetraciclina (78,2 %) y ampicilina (65,5 %). Entre los aislados el 50,9 % eran cepas multirresistentes productoras de BLEE, y portadoras principalmente de los genes *bla_{TEM}* (98,2 %) y *bla_{CTX-M}* (94,5 %) [39]. Otro estudio realizado, en 2018 en Portugal, por Joana Freitas y col., informaron a cerca de la presencia de tres cepas de *E. coli* resistentes a colistina, aisladas del contenido intestinal de tres conejos de producción intensiva necropsiados

con un historial previo de pienso medicado con colistina. En este estudio la resistencia a la colistina se relacionó con cepas portadoras del gen *mcr-1*, portado por los plásmidos ST2 y ST4 altamente diseminados [40]. Por otro lado el estudio realizado en 2019 en Alejandría consiguió aislar 152 cepas de *E. coli*, procedentes de 250 hisopos con contenido intestinal de conejos, que mostraron tras la realización de un antibiograma por el método de difusión disco placa una resistencia del 100 % frente a la ampicilina y a la amoxicilina / ácido clavulánico. Dentro de las cepas aisladas, un 42,85 % presentaron resistencia frente a la tetraciclina y un 34,29 % frente a trimetoprima-sulfametoxazol, mostrando una elevada susceptibilidad frente a gentamicina, norfloxacino, y estreptomina [41]. Por otro lado, un estudio más reciente realizado en 2021 en Malasia, muestra el análisis de 51 cepas de *E. coli* procedente de 100 muestras rectales de conejos y el mismo número procedentes de muestras cloacales de pollo. Tras analizar las muestras mediante PCR para la detección de genes portadores de resistencias antibióticas frente a betaláctamicos y carbapenémicos, no se detectó ninguna cepa productora de BLEE ni de carbapenemasas (CREC) en conejos, a diferencia de las cepas de *E. coli* aisladas en pollos, en las que si se encontraron 12 de 220 cepas productoras de BLEE y 2 de 200 cepas productoras de CREC [42]. Un estudio realizado en Italia en 2021 por Massella y col., en el que se analizaron, en este caso cepas ExPEC, muestra que los conejos y las aves de engorde son las fuentes con resistencia a antibióticos más extensa, con el 100 % (23/23) de las muestras de conejo con aislados de cepas ExPEC resistentes al menos a un antibiótico de los utilizados y 22 de las 23 cepas aisladas MDR. Además, el conejo fue identificada como reservorio de cepas resistentes a colistina y principalmente asociadas al filogrupo B1 de *E. coli* [43]. El último estudio realizado sobre los conejos como reservorio de cepas de *E. coli* multirresistentes fue en el año 2024 por Silva y col., en Portugal, en el cual se estudiaron 292 muestras fecales de conejos, de las cuales se aislaron 48 muestras de ExPEC resistentes a cefotaxima. Los genes BLEE asociados con estas cepas fueron *bla_{CTX-3G}* (72,91 %), *bla_{CTX-M9}* (60,41 %), *bla_{TEM}* (62,5 %), *bla_{SHV}* (6,25 %). Además estas cepas también presentaron resistencias frente a antimicrobianos de importancia crítica en medicina humana y en medicina veterinaria, las cuales se muestran a continuación ordenadas de mayor a menor: ampicilina (100 %), aztreonam (97,8 %), estreptomina (93,7 %), tetraciclina (91,6 %), trimetoprima-sulfametoxazol (75 %), cloranfenicol (72,9 %), tobramicina (64,58 %), amoxicilina / ácido clavulánico (54,16 %), ciprofloxacino (25 %), ceftazidime (14,58 %), gentamicina (10,41 %) y amikacina (8,3 %). Ninguna cepa presentó resistencia frente a los carbapenémicos y todas las cepas aisladas mostraron perfiles MDR, siendo la mayoría resistentes frente a un antibiótico perteneciente a seis familias antibióticas diferentes. El filogrupo A fue el más prevalente en estas muestras (56,25 %), seguido del filogrupo B1(37,5 %) y del filogrupo D (2,08 %) [44].

2. Objetivos

El presente trabajo de fin de grado se ha realizado en el marco del Proyecto Nacional PID 2011-133041OB-100, financiado por MICIU/AEI/10.130139/501100011033/ y por FEDER “Una manera de hacer Europa”. En él se incluye la monitorización de antibiorresistencias en conejos de producción intensiva de carne con patología digestiva compatible con colibacilosis.

La motivación general del presente estudio fue conocer la situación actual de la colibacilosis en producción cunícola, así como la caracterización de las cepas *E. coli* implicadas y la monitorización de las resistencias antibióticas asociadas.

Los objetivos específicos de este proyecto fueron:

- I.** Elaborar un protocolo de diagnóstico de colibacilosis en muestras de conejos con patología digestiva, para la detección de cepas de *E. coli* enteropatógeno (EPEC).
- II.** Caracterización genotípica y fenotípica de cepas EPEC.
- III.** Conocer la situación actual en producción cunícola, en relación con la salud intestinal, tras la restricción en el uso de piensos medicamentosos como profilácticos.

3. Material y métodos

La metodología empleada en este TFG está basada en la previamente descrita en los trabajos de García-Meniño y col. (2022) [45] y Dafne-Jiménez y col. (2021) [46], con las modificaciones que se indican a continuación y siguiendo el diagrama de trabajo que muestra la Figura 1:

3.1. Muestras y colección de *E. coli*

Las muestras analizadas en este estudio consistieron en 60 hisopos de contenido intestinal conservados en medio Amies, y recogidos de forma individual durante los meses de agosto a octubre del año 2023. Las muestras se obtuvieron en 10 explotaciones, de producción cunícola en etapa de cebo (30-60 días) con problemas de diarrea, localizadas en las provincias de Pontevedra, Ourense, Zamora y Albacete. Las muestras se recibieron en el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), localizado en la unidad de microbiología de la Facultad de Veterinaria de Lugo. Estas se analizaron como parte de la última fase del proyecto “Caracterización de cepas *E. coli* en cunicultura y las antibiorresistencias relacionadas” llevado a cabo durante 2023 y 2024, en colaboración con el PRAN.

Los 60 hisopos de contenido intestinal fueron sembrados en placas de MacConkey Lactosa (ML, Oxoid), un medio selectivo, que impide el crecimiento de bacterias Gram positivas y favorece el crecimiento de bacterias Gram negativas como son las enterobacterias, y diferencial que permite discernir entre bacterias fermentadoras de lactosa y no fermentadoras. Tras el periodo de incubación a 37 °C durante 18-24 h, el crecimiento en confluente del medio ML se procesa mediante reacción en cadena polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR).

3.2. PCR convencional

Para llevar a cabo la PCR convencional primero se extrae el ADN bien a partir del confluente del medio ML o bien a partir de colonias aisladas, crecidas individualmente en medio agar tripton de soja (TSA, Oxoid), un medio general poco exigente, que permite el crecimiento abundante de cultivo puro. Se prepara una suspensión con un asa estéril de 1 µL, cogiendo una cantidad de contenido celular de crecimiento equivalente a una o dos colonias, que se suspende en un volumen de 600 µL de agua MiliQ estéril en un tubo eppendorf. Se calienta la suspensión 5 min a la temperatura de ebullición del agua, y tras dejar atemperar, se centrifuga a 12000 rpm durante 2 min. Del sobrenadante resultante se emplearán, 5 µL de ADN en la PCR. La reacción de PCR se realiza a volumen final 25 µL, compuesto por 12,5 µL de *Green Master Mix* (NZYTech®), 5 µL de ADN, y las concentraciones y volúmenes de *primers*, así como la cantidad de agua destilada estéril, específica para cada PCR. Se amplifica el ADN en termocicladores modelo *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler*, cuyas condiciones generales fueron (Figura 3):

- Desnaturalización inicial (94 °C/ 3 min)
- Desnaturalización (35 ciclos de 94 °C/ 1 min). Anillamiento de polimerasa (tª hibridación/ 1 min) y elongación (72 °C/ 1min y 30 s)
- Elongación final (72 °C/ 3 min)

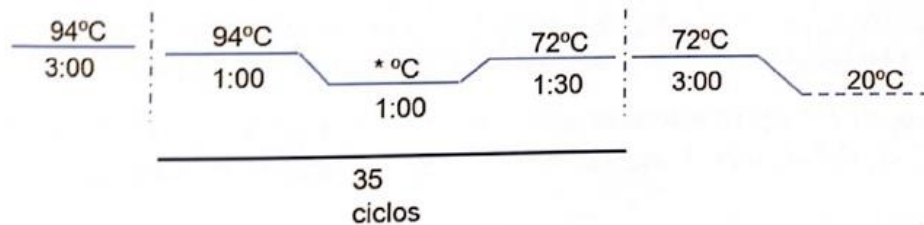


Figura 3. Condiciones de amplificación PCR [47].

***tª hibridación para cada primer indicada en las tablas de primers utilizados**

El revelado de las PCR se realiza mediante electroforesis convencional en gel de agarosa (Agarose D1 LE, Intron Biotechnology) al 1,5 % en tampón TAE 1x (Tris, acetato, EDTA). Para la visualización del gel se añaden 3 µL de marcador *GreenSafe Premium* (NZYTech®) por cada 100 mL de gel. Se cargan 10 µL de la muestra amplificada en cada pocillo del gel que posteriormente se visualizará bajo luz ultravioleta en el lector de imágenes Gel Doc XR de Bio-Rad.

En este estudio se realiza una PCR convencional a todos los confluentes crecidos en placas ML donde se han sembrado las 60 muestras de contenido intestinal, para la amplificación del gen *eae* (Tabla 1), que codifica para una intimina específica del patotipo EPEC. De las placas ML con confluentes positivos para al gen *eae*, se selecciona al menos una colonia compatible morfológicamente con *E. coli* y se siembra en medio TSA, para obtener una colonia pura. Una vez aisladas las colonias en TSA se les realiza individualmente una PCR de amplificación para el gen *uidA* (Tabla 2), que codifica para la enzima beta-glucuronidasa, producida por *E. coli*, y otra PCR para la amplificación del gen *eae*, lo que nos permite comprobar que se tratan de aislados EPEC. Una vez identificadas las cepas como EPEC, son caracterizadas fenotípicamente y genotípicamente, obteniéndose el perfil de antibiorresistencia de cada una de ellas. Este método se empleará de nuevo en el apartado 3.4, para realizar la caracterización genotípica de las cepas EPEC.

Gen	Primers	Secuencia nucleótidos (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
<i>eeae</i>	EAE-V3F	CATTGATCAGGATTTTTCTGGT	510	54	Mora y col., 2011 [48]
	EAE-MBR	TCCAGAATAATATTGTTATTACG			

Tabla 1. Primers utilizados para la detección del gen *eeae*.

Gen	Primers	Secuencia nucleótidos (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
<i>uidA</i>	uidA-F	GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG	503	60	Gómez Duarte y col., 2010 [49]
	uidA-R	GTTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCT			

Tabla 2. Primers utilizados para la detección del gen *uidA*.

3.3. Caracterización fenotípica

A partir de las cepas EPEC previamente confirmadas y aisladas en medio TSA, se procedió a la caracterización fenotípica de sensibilidad a los antibióticos, expresada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), que hace referencia a la cantidad mínima de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de un patógeno. Esta caracterización se realizó en el Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia (LASAPAGA), en el equipo automatizado *Vitek 2 Advanced Expert System* (BioMérieux). Este sistema analiza la susceptibilidad bacteriana empleando tarjetas identificativas, con reactivos colimétricos, que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro bacteriano, ajustado previamente a una turbidez de 0,50-0,63 unidades de la escala McFarland, mediante un densímetro. Las tarjetas empleadas vienen incorporadas con los antibióticos que se mencionan a continuación, y que se recogen en la Tabla 3, clasificados según su familia antibiótica: ampicilina, amoxicilina / ácido clavulánico, ticarcilina / ácido clavulánico, cefalexina, cefalotina, cefoperazone, ceftiofur, cefquinome, imipenem, flumequine, enrofloxacino, marbofloxacino, gentamicina, neomicina, tetraciclina, polimixina B, trimetoprima/sulfametoxazol, y florfenicol.

Familia	Grupo	Antimicrobiano	Valores ECOFF 2023	
Aminoglucósidos		gentamicina	>2 mg/L	
		neomicina	>8 mg/L	
Betalactámicos	Penicilinas		ampicilina >8 mg/L	
	Penicilinas +Inhibidor de betalactamasa	amoxicilina + ácido clavulánico	>8 mg/L	
		ticarcilina + ácido clavulánico	>16 mg/L ^a	
	Cefalosporinas	1 ^a y 2 ^a Generación	cefalotin	>32 mg/L
			cefalexina	>32 mg/L
		3 ^a y 4 ^a Generación	cefquinoma	>4 mg/L ^b
			ceftiofur	>1 mg/L
			cefoperazona	>1 mg/L
	Carbapenemes		imipinem	>0,5 mg/L
Fenicoles		florfenicol	>16 mg/L	
Quinolonas	Fluoroquinolonas	flumequine	>2 mg/L	
		enrofloxacino	>0,125 mg/L	
		marbofloxacino	>2 mg/L ^b	
Polimixinas		colistina	>2 mg/L ^a	
Sulfonamidas + Diamiropiridinas		trimetroprima + sulfametoxazol	>0,5 mg/L	
Tetraciclinas		tetraciclina	>8 mg/L ^c	

Tabla 3. Antibióticos utilizados en este estudio, clasificados por familia, grupo, y criterios de interpretación.

^a Valores de referencia obtenidos Breakpoint Clínico 2023. ^b Valores de referencia obtenidos de CASFM 2023. ^c Valores de referencia Clinic EUCAST

Este equipo ofrece los resultados de sensibilidad antibiótica tomando como referencia las normas proporcionadas por el Comité Europeo de Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST), que establece los puntos de corte de las concentraciones mínimas y máximas, así como los puntos de corte epidemiológicos de cada antibiótico denominados ECOFF, que permiten separar las poblaciones que no expresan mecanismos de resistencia, conocidas como fenotipos salvajes, de las que sí lo expresan. Finalmente, se categorizan fenotípicamente las bacterias, como: “R”, aquellas bacterias resistentes al antibiótico analizado y “S”, aquellas bacterias sensibles al antibiótico analizado a dosis estándar. En este caso se toman de referencia los valores ECOFF 2023, salvo para algún antibiótico que no consta en la base de datos del equipo automatizado, y para el que se tienen en cuenta los datos recogidos en *breakpoints* clínicos, el *Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CASFM 2023) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), como se muestra en la Tabla 3.

3.4. Caracterización genotípica

Tras obtener el perfil de antibiorresistencia de las cepas identificadas como EPEC, se realizó una caracterización genotípica de aquellas que presentaron resistencia frente a la polimixina B y a las cefalosporinas de 3^a y 4^a generación. También se realizó la secuenciación de fragmentos cortos de ADN tipo Sanger para el tipado molecular de genes BLEE, tal como se explica en el siguiente apartado. Adicionalmente se realizó una PCR multiplex, para determinar los grupos filogenéticos de dichas cepas y completar su tipificación, tal como se muestra en el apartado 3.4.2.

Mediante el empleo de PCR y los *primers* específicos para cada una, se determinó:

- Detección de genes de resistencia *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* que codifican para la producción de BLEE y así como de betalactamasas tipo AmpC (CIT), que codifican para la producción de cefalosporinas. Los *primers* empleados para estas PCR se indican en la Tabla 4.
- Tipificación de *bla_{CTX-M}*, discerniendo si se trata de grupo 1 o 9, los más prevalentes. Los *primers* empleados en esta PCR se indican en la Tabla 5.
- Detección de genes de resistencia frente a la polimixina B o colistina, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*. Los *primers* empleados en esta PCR se indican en la Tabla 6.

Gen	Primers	Secuencia nucleótidos (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
<i>CIT</i>	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	64	Pérez Pérez & Hanson, 2022 [50]
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
<i>bla</i> CTX-M	CTX-C3	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG	542	55	Mora y col., 2013 [51]
	CTX-C4	ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC			
<i>bla</i> SHV	SHV-F2	TTGTGCGTTCTTTACTCGCC	879	64	Mora y col., 2013 [51]
	SHV-R2	CCCGGCGATTGCTGATTTTCGC			

Tabla 4. Primers utilizados para la detección del gen CIT y genes BLEE (*bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV}).

Gen	Primers	Secuencia nucleótidos (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
<i>bla</i> CTX-M- grupo 1	M13U	GGTAAAAAATCACTGCGTC	863	60	Saladin y col., 2002 [52]
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
<i>bla</i> CTX-M- grupo 9	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	64	Simarro y col., 2000 [53]
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			

Tabla 5. Primers utilizados para la discernir entre el grupo 1 y 9 del gen *bla*_{CTX-M}.

Gen	Primers	Secuencia nucleótidos (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
<i>mcr-1</i>	CLR5-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	57	Liu y col., 2016 [54]
	CLR5-R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG			
<i>mcr-2</i>	mcr-2 IF	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	567	58	Xavier y col., 2016 [55]
	mcr-2 IR	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG			
<i>mcr-3</i>	Mcr3_900bp_fw	AAATAAAAAATTGTTCCGCTTATG	929	58	Rebello y col., 2018 [56]
	Mcr3_900bp_rev	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
<i>mcr-4</i>	mcr-4 FW	ATTGGGATAGTCGCCTTTTT	487	58	Carattoli y col., 2017 [57]
	mcr-4RV	TTACAGCCAGAATCATTATCA			
<i>mcr-5</i>	MCR5_FW	ATGCGGTTGTCTGCATTATC	1644	50	Borowiak y col., 2017 [58]
	MCR5_RV	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG			

Tabla 6. Primers utilizados para realizar la PCR multiplex para detectar cepas resistentes a colistina mediante los genes: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*.

3.4.1. Secuenciación de fragmentos cortos tipo Sanger

La secuenciación se empleó para el tipado del gen *bla_{CTX-M}*, a nivel de secuencia. La secuenciación de fragmentos cortos se lleva a cabo a partir del producto amplificado mediante PCR específica de las regiones diana a amplificar. Esta PCR se hace a volumen final 50 µL (49 µL de mezcla y 1 µL de ADN), compuesto por: 10 µL de 5x My Taq™ Reaction Buffer (Bioline) que incluye los dNTPs y el MgCl₂, 37,8 µL de agua filtrada y estéril comercial (SIGMA®), 0,2 µL de *MyTaq™ DNA polymerase* (Bioline) y los primers correspondientes según el grupo de CTX-M identificado, que se indican en la Tabla 7. El ADN se extrae previamente en 500 µL de agua ultrapura, y se calienta a 100 °C/ 5 min.

Para el revelado de esta PCR, se carga en cada pocillo del gel de agarosa 7 µL, previamente se debe de mezclar con 5µL de ADN de la muestra amplificada con 2 µL de un tampón de carga, que confiere peso y color a los nucleótidos, haciendo visible su migración por el gel a la lectura bajo luz ultravioleta mediante el lector de imágenes Gel Doc XR de Bio-Rad.

Se procede a la secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados mediante el método Sanger, en la Red de Infraestructuras y Apoyo a la Investigación y al Desarrollo Tecnológico (RIAIDT), en la Facultad de veterinaria, Campus Terra, Universidad de Santiago de Compostela. Las secuencias obtenidas se compararon con bases de datos online que ofrece el *Center for Genomic Epidemiology*, concretamente en sus servicios *ResFinder 4.5* y *KmerResistance 2.2*.

Gen	Primers	Secuencia nucleótidos (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
bla <i>CTX-M</i> - grupo 9	CTX-M9-14-14B-24F	GAATACTGATGTAACACGGA	998	44	García-Meniño y col.,2018 [59]
	CTX-M9-R5	AGCTGAAGATGTAACACGGA			
bla <i>CTX-M</i> - grupo 9	CTX-M9-14-14B-24F	GAATACTGATGTAACACGGA	989	52	García-Meniño y col.,2018 [59]
	CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
bla <i>CTX-M</i> - grupo 9	CTX-M9-14B-F	CCTATACCCGAGGCGCGACAG	1059	44	García-Meniño y col.,2018 [59]
	CTX-M9-R5	AGCTGAAGATGTAACACGGA			
bla <i>CTX-M</i> - grupo 9	CTX-M14-24-F	CTAAATTCTTCGTGAAATAGTG	1049	44	García-Meniño y col.,2018 [59]
	CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
bla <i>CTX-M</i> - grupo 1	CTX-15-F1	GAAGCTAATAAAAAACACACGTGG	1044-1123	52	Mora y col., 2013 [51]
	CTX-15-R	GTATGCGCAAGCGCAGGTGG			

Tabla 7. *Primers* utilizados para la PCR de amplificación del ADN previo a la secuenciación de fragmentos cortos tipo Sanger.

3.4.2. Determinación de grupo filogenético

Adicionalmente se determinó el filogenio de las cepas EPEC aisladas. Para ello se empleó la técnica de PCR multiplex, mediante la amplificación de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspEC*, cuyos *primers* se muestran en la Tabla 8. Esta PCR permite discriminar 7 filogrupos (A, B1, B2, C, D, F,G),. Los resultados son interpretados en base al esquema ampliado descrito por Clermont y col. [24], y su actualización con el nuevo grupo filogenético G [25], mediante la ausencia (-) o presencia (+) de los genes mencionados. En función de los resultados obtenidos puede ser necesario la realización de otras PCR convencionales para discriminar entre los grupos A/C, D/E y F/B2/G respectivamente.

Gen	Primers	Secuencia nucleótidos (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	58	Clermont y col., 2013 [24]
	ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288		Clermont y col., 2013 [24]
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i>	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211		Clermont y col., 2013 [24]
	yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152		Clermont y col., 2013 [24]
	TspEaC2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			

Tabla 8. *Primers* utilizados para la PCR de filogenio por el método de Clermont.

4. Resultados

4.1. Aislamientos EPEC

La reacción de PCR realizada sobre el crecimiento confluyente del medio ML, amplificó el gen *eae* en 29 muestras de las 60 analizadas (48%). En cuanto al análisis por colonias, ha sido posible recuperar 21 colonias de las 29 muestras positivas para el gen *eae* (Figura 4), que además fueron positivas para el gen *uidA* específico de la especie *E. coli* (Figura 5).

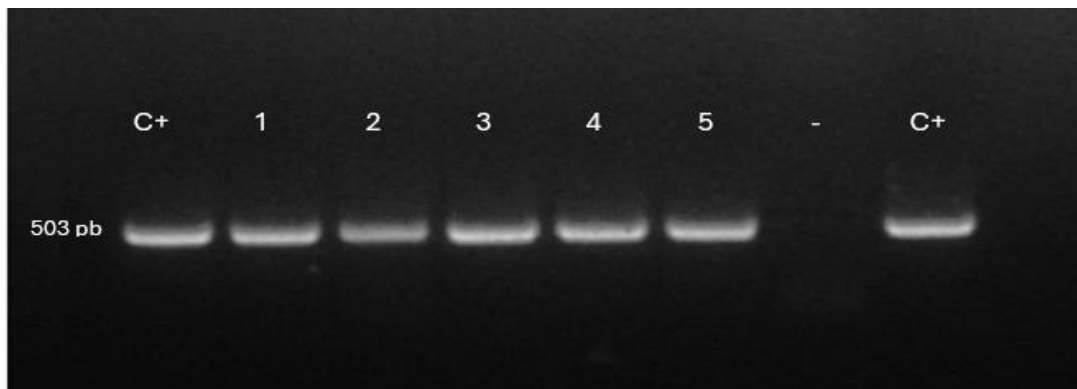


Figura 4. Imagen perteneciente al gel de electroforesis, en el que se representan 5 cepas individuales, positivas para el gen *uidA* (503 pb) específico de *E. coli*.

C+: control positivo, -: control negativo, 1-5: cepas EPEC

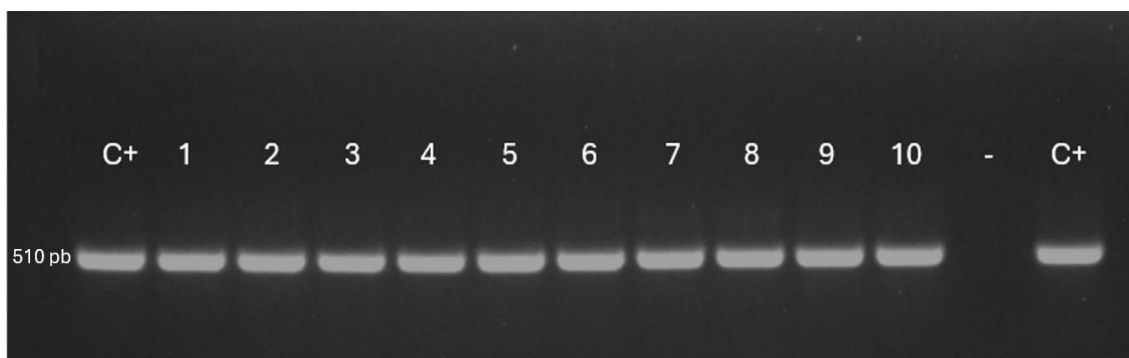


Figura 5. Imagen perteneciente al gel de electroforesis, en el que se representan 10 cepas individuales positivas para el gen *eae* (510 pb), lo que indica que las cepas son EPEC.

C+: control positivo, -: control negativo, 1-10: cepas EPEC.

4.2. Caracterización fenotípica de antibiorresistencias por CMI

Los resultados obtenidos en los antibiogramas se muestran en la Figura 6. La mayor resistencia en esta colección de 21 cepas de EPEC fue frente a la tetraciclina en 20/21 (95,2 %) cepas. El resto de resistencias encontradas se indican a continuación en orden decreciente, de mayor a menor resistencia: flumequine, enrofloxacino y gentamicina en 16/21 (76,2 %); ampicilina y trimetoprima/sulfametoxazol en 14/21 (66,6 %); neomicina en 11/21 (52,4 %); polimixina B en 8/21 (38,1 %); marbofloxacino en 4/21 (19,1 %); florfenicol en 2/21 (9,5 %); amoxicilina / ácido clavulánico, cefalexina, cefalotin, cefoperazona, ceftiofur, cefquinome en 1/21 (4,8 %). En cambio ninguna de las cepas ha presentado resistencia frente a ticarcilina / ácido clavulánico ni a imipenem.

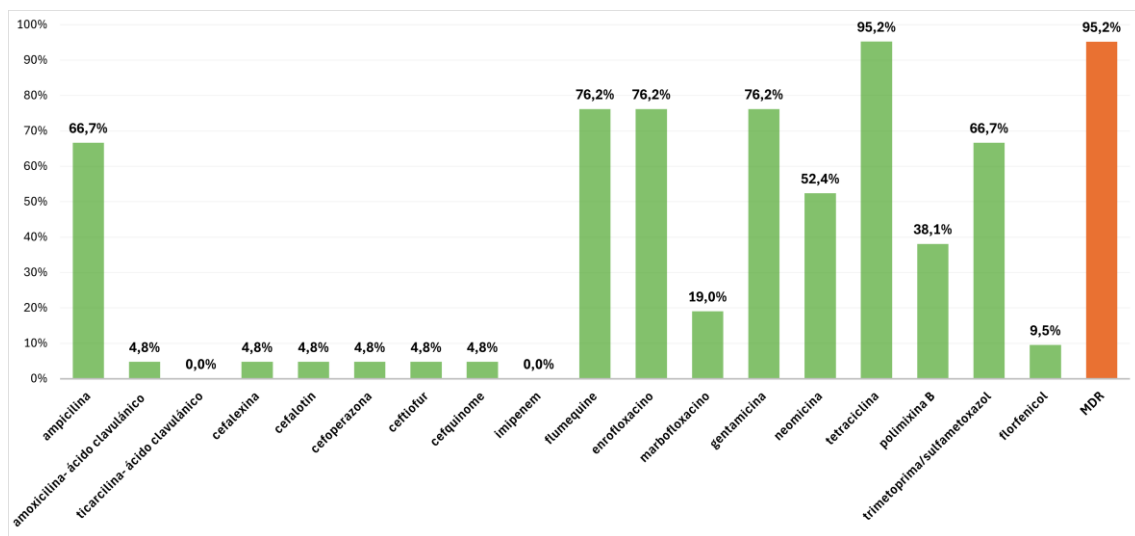


Figura 6. Gráfica que muestra los resultados de antibiorresistencia de las 21 cepas EPEC obtenidos en el antibiograma por CMI.

MDR: cepas que presenta resistencia al menos a un antibióticos en tres categorías distintas.

De acuerdo con Magiorakos y col., la multirresistencia se define como la resistencia a al menos un agente en tres o más categorías antimicrobianas, encontrándose en este estudio 19/21 (90,5 %) cepas multirresistentes (MDR)[60]. Concretamente 5/19 (26,3 %) cepas presentan resistencia frente a 6 familias de antibióticos diferentes, 8/19 (42,1 %) cepas presentan resistencia frente a 5 familias de antibióticos diferentes, 1/19 (5,3 %) cepa presenta resistencia frente a 4 familias de antibióticos diferentes y 5/19 (26,3 %) cepas presentan resistencia frente a 3 familias antibióticas diferentes. Además, se detectó una cepa que presenta resistencia a las cefalosporinas incluídas dentro de la familia de los betalactámicos de espectro extendido. Esta cepa es también MDR, al presentar resistencia frente a 6 de las familias farmacológicas empleadas en el antibiograma: betalactámicos (penicilinas: ampicilina; cefalosporinas de primera y segunda generación: cefalexina, cefalotin; cefalosporinas de tercera y cuarta generación: cefoperazona,

ceftiofur, cefquinoma), aminoglucósidos (gentamicina, neomicina), fluoroquinolonas (flumequine, enrofloxacino), tetracilinas (tetraciclina), sulfonamidas y diamirpiridinas (trimetroprima/sulfametoxazol).

4.3. Caracterización genotípica de RAM

En base a la caracterización fenotípica de las cepas EPEC aisladas, se ha encontrado 1/21 (4,76 %) cepa EPEC que presenta resistencia al grupo de las cefalosporinas de 3^a y 4^a generación, incluido dentro de la familia de los betalactámicos. Mediante PCR se rastrearon los genes de resistencia asociados a este fenotipo, como son la producción de cefalosporinasas (CIT) o de BLEE. Se detectó que esta cepa no es productora de CIT, pero si de BLEE y portadora del gen *bla*_{CTX-M} (grupo 9).

Además, fenotípicamente se detectaron 8/21 (38,1 %) cepas EPEC resistentes a la polimixina B. Todas ellas fueron positivas, por PCR para el gen plasmídico *mcr-1* que codifica para resistencia a la colistina, tal como se muestra en la Figura 7.

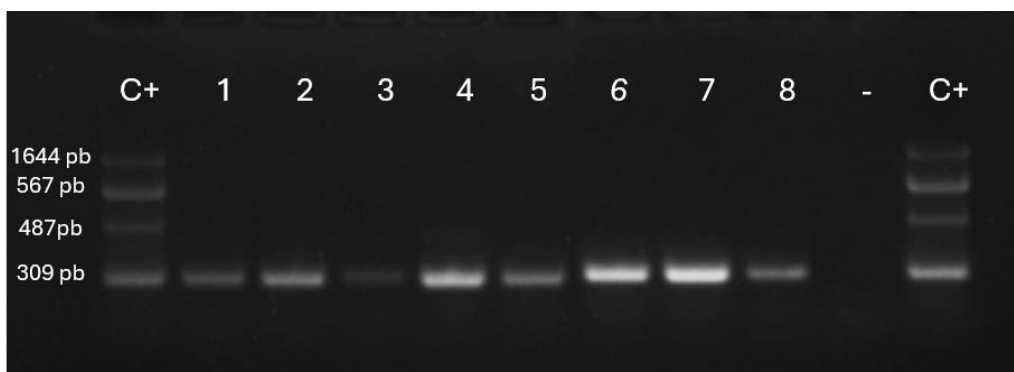


Figura 7. Imagen perteneciente al gel de electroforesis, en el que se representan las 8 cepas aisladas resistentes a colistina, cuyas reacciones son positivas para el gen *mcr-1* (309 pb).

C+: control positivo, -: control negativo, 1-8: cepas EPEC de conejo aisladas que presentan resistencia frente a la polimixina B .

4.3.1. Secuenciación del gen *bla*_{CTX-M}

La secuenciación del gen *bla*_{CTX-M} de la cepa EPEC , mediante secuenciación tipo Sanger y posterior comparación con la base de datos ofrecida por *Center of Genomic Epidemiology*, (*ResFinder 4.5* y *KmerResistance 2.2*), identificó el gen *bla*_{CTX-M-9}, con un 99.89 % de similitud. Además, esta base de datos nos ha proporcionado un perfil fenotípico antibiótico predictivo que coincide con los resultados obtenidos en el antibiograma por el método CMI [61,62].

4.4. Caracterización filogenética de las cepas EPEC

En este estudio las 21 cepas EPEC aisladas se han clasificado dentro del filogrupo B1, de acuerdo al método propuesto por Clermont y col. y recogido en el esquema que se muestra en la Figura 9 [24], al resultar positiva la reacción de PCR que amplifica los genes *arpA* y *TsEp4C2* como se muestra en la Figura 8.

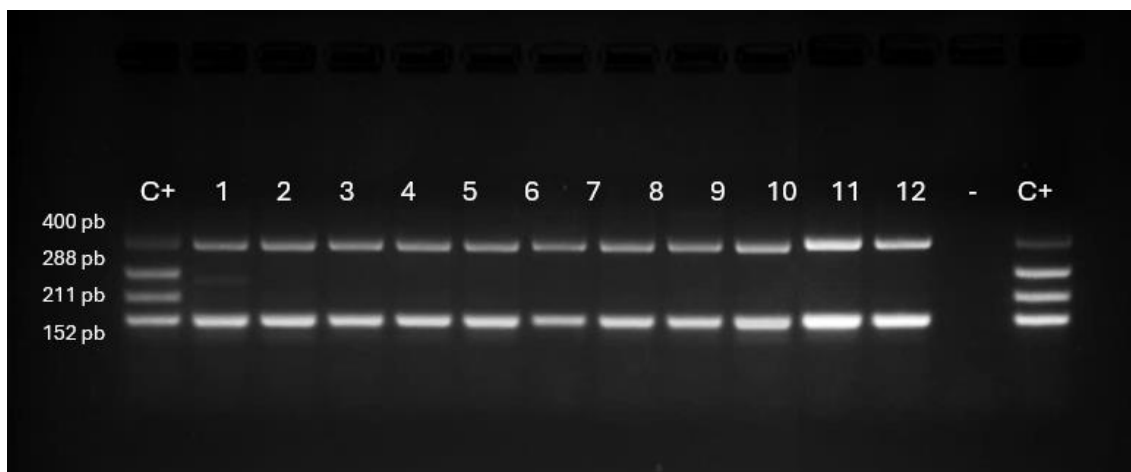


Figura 8. Imagen perteneciente al gel de electroforesis, en el que se representan 11 cepas EPEC analizadas, cuyas reacciones son positivas para el gen *arpA* (400 pb) y para el gen *TsEp4C2* (152 pb).

C+: control positivo, -: control negativo, 1-12: cepas EPEC de conejo aisladas.

<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)	Phylo-group
+	-	-	-	A
+	-	-	+	B1
-	+	-	-	F
-	+	+	-	B2
-	+	+	+	B2
-	+	-	+	B2
+	-	+	-	A or C
+	+	-	-	D or E
+	+	-	+	D or E
+	+	+	-	E or clade I
-	-	+	-	Clade I or II
-	(476) ^o	-	-	Clade III, IV or V
-	-	-	+	Unknown
-	-	+	+	Unknown
+	-	+	+	Unknown
+	+	+	+	Unknown
-	-	-	-	Unknown

Figura 9. Esquema de Clermont y col., que se toma de referencia para la interpretación de la PCR multiplex de filogrupo [24].

A continuación, en la Tabla 9 se muestra un resumen con la caracterización y tipificación de todas las cepas EPEC aisladas en conejos que se analizaron en este estudio.

Código LREC	Filogrupo	Perfil Genotípico RAM	Perfil fenotípico RAM	BLEE	MDR	Tipificación ESB y MCR
8-CO	B1	-	FLU, ENR, GEN	-	-	-
10-CO	B1	-	AMP, FLU, ENR, MRB, GEN, TCY, SXT	-	Si	-
11-COa	B1	-	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY, SXT	-	Si	-
11-COb*	B1	CTX-M	AMP, CEF, CEP, CFP, EFT, CEQ, FLU, ENR, GEN, N, TCY, SXT	+	Si	CTX-M9
12-CO	B1	MCR	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY, PB, SXT	-	Si	MCR-1
13-CO	B1	-	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY, SXT	-	Si	-
14-CO	B1	MCR	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY, PB, SXT	-	Si	MCR-1
15-CO	B1	-	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY, SXT	-	Si	-
16-CO	B1	-	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY, SXT	-	Si	-
17-CO	B1	-	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY, SXT	-	Si	-
20-CO	B1	-	FLU, ENR, TCY	-	-	-
22-CO	B1	-	FLU, ENR, TCY, SXT	-	Si	-
25-CO	B1	MCR	TCY, PB, SXT	-	Si	MCR-1
26-CO	B1	MCR	TCY, PB, SXT	-	Si	MCR-1
37-CO	B1	-	GEN, N, TCY, SXT	-	Si	-
38-CO	B1	-	GEN, N, TCY, SXT	-	Si	-
49-CO	B1	-	AMP, FLU, ENR, GEN, N, TCY	-	Si	-
55-CO	B1	MCR	AMP, TCY, PB	-	Si	MCR-1
58-CO	B1	MCR	AMP, FLU, ENR, MRB, GEN, TCY, PB, FFC	-	Si	MCR-1
59-CO	B1	MCR	AMP, FLU, ENR, MRB, GEN, TCY, PB	-	Si	MCR-1
60-CO	B1	MCR	AMP, FLU, ENR, MRB, GEN, TCY, PB, FFC	-	Si	MCR-1

Tabla 9. Caracterización de las 21 cepas EPEC aisladas procedentes de las 60 muestras de contenido intestinal de conejo. *Cepa EPEC BLEE

ampicilina (AMP), amoxicilina/ác. clavulánico (AMC), tricarcilina/ác. clavulánico (TIC), cefalexina (CEF), cefalotina (CEP), cefoperazona (CFP), ceftiofur (EFT), cefquinoma (CEQ), imipinem (IPM), flumequine (FLU), enrofloxacin (ENR), marbofloxacin (MRB), gentamicina (GEN), neomicina (N), tetraciclina (TCY), polimixina B (PB), trimetoprima/Sulfametoxazol (SXT), florfenicol (FFC)

5. Discusión

La colibacilosis es la segunda patología digestiva con mayor incidencia en gazapos en periodo de cebo, que genera elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en el sector, dando lugar a importantes pérdidas económicas [1,2]. En la actualidad, el aumento de bacterias multirresistentes y la aplicación de las nuevas restricciones legislativas en el ámbito veterinario referentes al uso de antibióticos, hace necesario realizar un abordaje de la situación en la que se encuentra la microbiota intestinal de los conejos pertenecientes al sector cunícola en España. Este incremento progresivo de RAM entre las enterobacterias presentes en animales de producción y su posible transmisión a los seres humanos, representa un importante problema para la salud pública, al disminuir la eficiencia de los tratamientos frente a las infecciones causadas por bacterias MDR [8,10,29]. Existen pocos estudios que aborden la caracterización filogenética y de la MDR en cepas EPEC implicadas en colibacilosis en producción cunícola, por lo que se compararan los resultados con estudios que aislaron cepas de *E. coli* en contenido intestinal de conejos. En este estudio, se determinó que alrededor del 50 % de muestras procedentes de contenido intestinal de conejos con sintomatología diarreica, presentaban un crecimiento abundante de *E. coli*, lo que coincide con los estudios realizados en Alejandría y en Malasia [41,42]. Además, se identificó una cepa EPEC productora de BLEE, al contrario que en el estudio realizado en Malasia, donde no se aisló ninguna cepa de *E. coli* BLEE en conejos [42]. El gen *bla*_{CTX-M-9}, dentro de la familia CTX-M de BLEE es el predominante en cunicultura en España, siendo el identificado en este estudio. En cambio en el estudio realizado en Portugal por Silva y col. el gen predominante ha sido el gen *bla*_{CTX-3G} [44,64]. Destacar que cepas de *E. coli* como la encontrada en el estudio, que presentan resistencia frente a cefalosporinas de tercera generación han sido incluídas por la OMS en la lista actualizada de patógenos bacterianos críticos [33]. Resulta sorprendente la recuperación de cepas EPEC productoras de BLEE en cunicultura, ya que los betalactámicos no están incluidos para el uso terapéutico de los conejos, al generar disbiosis asociadas a enteritis e incluso enterotoxemias en el conejo [44,63]. Una posible explicación a la presencia de betalactamasas en bacterias procedentes de animales de producción podría ser la coselección que se produce al administrar otros antibióticos no pertenecientes a las familias de betalactámicos cuyos genes de resistencia, están localizados en plásmidos o incluidos en elementos móviles, como transposones o integrones, que los incluyen dentro de fragmentos del cromosoma [63]. No se ha encontrado ninguna cepa EPEC productora de carbapenemasas ni que presente resistencia frente a imipenem, al igual que en los estudios realizados por Chai y col., y por Zhao y col. [39,42].

Por otro lado, se han identificado 8 de 21 cepas (38,1 %) portadoras del gen de resistencia *mcr-1* y resistentes a la polimixina B, al igual que en el estudio realizado en Portugal por Freitas y col. donde todas los aislados de *E. coli* en conejos fueron resistentes a colistina y portadores del

gen *mcr-1*. He de destacar que en ese estudio solo se analizaron tres conejos, los cuales recibían una dieta basada en pienso medicado con colistina [40]. La colistina es un antibiótico que fue muy empleado como profiláctico en los piensos medicamentosos tanto en conejos como en porcino. Aunque en los resultados obtenidos se aprecia una disminución en la resistencia a la colistina en cunicultura, sector que ya ha disminuído su uso un 95 % gracias al plan REDUCE propuesto por el PRAN, llevado a cabo durante el periodo 2019-2021, todavía no ha llegado a los niveles de reducción cercanos al 100% actuales que presenta el sector porcino, ya que existen cepas portadoras de genes de resistencia frente a este antibiótico, de los cuales se espera una reducción próxima al 100% [5,65], .

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos mediante el método de CMI revelaron que *E. coli* mostró un nivel de resistencia alto frente a algunos de los antibióticos, destacando la elevada resistencia frente a tetraciclina (95,6 %), superiores a las indicadas en los estudios consultados [39,41,42], pero un porcentaje similar al estudio realizado en 2024 en Portugal, donde el porcentaje fue de (91,6 %) [44]. También se ha encontrado un 66,67 % de cepas resistentes a ampicilina, un porcentaje similar al encontrado por Zhao y col. en China (65,5 %), pero menor al encontrado en por Mohamed y col. en Alejandria y en Portugal por Silva y col. donde la resistencia frente a ampicilina de las cepas de *E. coli* en conejos era del 100 % [39,41,44]. Adicionalmente, se han encontrado cepas resistentes frente a antibióticos no reportados en las fuentes consultadas como son neomicina, marbofloxacino, florfenicol y flumequine, para los que encontramos una prevalencia del 76,19 % de resistencia. Una cepa mostró resistencia a amoxicilina / ácido clavulánico, un porcentaje significativamente menor al encontrado en las cepas de *E. coli* aisladas en Portugal en 2024 por Silva y col. (54,16 %), y en Alejandría en 2019 donde todas las cepas de *E. coli* en conejos eran resistentes [41,44]. No se ha encontrado ninguna cepa resistente a ticarcilina / ácido clavulánico, aunque el estudio realizado en Malasia indica que las cepas de *E. coli* han disminuído su susceptibilidad a la ticarcilina [42]. También se han encontrado 90,48 % de cepas *E. coli* MDR procedentes de contenido intestinal de conejos, un porcentaje que equivalente aproximadamente al doble encontrado en el estudio realizado en 2018 en China por Zhao y col., donde el porcentaje de cepas de *E. coli* MDR era de 50,9 % [39]. Dentro de las MDR también se encuentran las 8 cepas portadoras del gen *mcr-1*, al igual que las aisladas por primera vez en Portugal en 2018, en el estudio realizado por Freitas-Silva y col., dichas cepas aisladas en ambos estudios, comparten resistencia frente a algunos antibióticos dentro de su fenotipo RAM, como son ampicilina, gentamicina, trimetoprima/ sulfometoxazol y tetraciclina, también encontradas en este estudio [40]. Las resistencias asociadas a cepas ExPEC en cunicultura en el estudio realizado en Italia, mostraron que las cepas EPEC son una fuente extensa de resistencias antimicrobianas aunque en menos medida que las cepas ExPEC [43].

En la Tabla 10 se muestran las resistencias encontradas en este estudio clasificadas según la categoría propuesta por la EMA [38] para el uso de antibióticos de manera racional en veterinaria. Teniendo en cuenta lo anterior y las [guías terapéuticas del PRAN](#), que muestran los antibióticos autorizados en cunicultura, se observan resistencias a antibióticos pertenecientes a familias de importancia crítica en medicina humana y en veterinaria como son los aminoglucósidos (gentamicina y neomicina) de uso restringido en veterinaria; los betalactámicos (ampicilina, cefquinoma, ceftiofur, cefazolina, cefalexina y amoxicila / ácido clavulánico) no autorizados en cunicultura; fluoroquinolonas (enrofloxanino, marbofloxacino y flumequine) de uso restringido en veterinaria; polimixinas (colistina) para el que se han detectado genes *mcr-1* portadores que podrían diseminarse desde los animales de producción a los humanos a través de la cadena alimentaria.

Categoría EMA	Resistencias antibióticas encontradas
B	cefquinoma*, ceftiofur*, polimixina B, enrofloxacino, flumequine, marbofloxacino
C	gentamicina, neomicina, amoxicilina / ácido clavulánico, cefalexina y cefazolina*, florfenicol
D	ampicilina, tetraciclina, trimetroprima/sulfametoxazol

Tabla 10. Resistencia a antibióticos clasificados en categorías para uso veterinario según la EMA [38].

*Resistencias encontradas en la cepa EPEC BLEE

Destacar que todas las cepas aisladas pertenecieron al filogrupo B1, el cual es el mayoritario en cepas EPEC procedentes de conejo, y el mayoritario entre la población comensal en conejo [14], aunque en el estudio realizado por Silva y col. en Portugal en 2024 el filogrupo mayoritario en las cepas BLEE pertenecían al filogrupo A (56,25%) [44]. Todas estas técnicas permiten establecer la relación clonal entre los aislados estudiados, un monitoreo de la evolución de las RAM en la producción cunícola, especialmente en relación a los genes de transmisión horizontal con importancia para la salud global (*One Health*), dada su potencial transmisión a través de la cadena alimentaria.

6. Conclusiones

1. Nuestros resultados determinan que aproximadamente un 50% de los casos de diarreas en conejos en fase de cebo (30-60 días), están asociados a cepas *E. coli* enteropatógena (EPEC).
2. Un diagnóstico específico de este patotipo, basado en la detección del gen *eae* codificador de la intimina, y el filogrupo, son clave para el control de la colibacilosis en cunicultura.
3. Los niveles de multirresistencia encontrados en las cepas patógenas EPEC de este estudio son muy elevados (90,5%), incluida la resistencia frente a antibióticos de último recurso como la colistina o las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, lo cual compromete el control terapéutico de esta patología.
4. A pesar de los programas “REDUCE” del PRAN, y de la reducción del 95% del consumo de colistina en el sector, el gen plasmídico *mcr-1* todavía presenta una alta prevalencia (38,1%), por lo que es fundamental su monitorización, y evitar la transmisión de este tipo de cepas a lo largo de la cadena de producción.

7. Bibliografía

1. Al-Soufi, S., Sevilla, L., García, J., López-Alonso, M., Cegarra, E. (2023). El sector cunícola, a examen: Los productores analizan la realidad de sus explotaciones con el objetivo de intentar reducir el uso de antibióticos. *ASESCU*, p.1-13. Consultado el 22 de abril del 2024 en <https://asescu.com/el-sector-cunicola-a-examen/>
2. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ,Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2023). El sector cunícola en cifras. Consultado el 22 de abril del 2024 en https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadores2022_tcm30-627054.pdf
3. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas. (2024). Indicadores trimestrales cunicultura: enero 2024. Consultado el 22 de abril de 2024 en https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/dashboardcunicultura-4trimestre2023ook_tcm30-585087.pdf
4. Falces, J.I. (2024). La producción de carne de conejo disminuye en España casi un 10%. *AgroNews Castilla y León*. Publicado el 11 de marzo de 2024 en el periódico Agronews Castilla y León. Consultado el 23 de abril del 2024 en <https://www.agronewscastillayleon.com/carne-de-conejo-cae-97/>
5. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Ministerio de Sanidad, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2022). Plan Nacional frente a la resistencia a los antibióticos 2020-2021. Consultado el 23 de abril de 2024 en <https://resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-anual-2020-2021-plan-nacional-frente-la-resistencia-los-antibioticos>
6. Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. (DOUE 4, 7.01.2019, p.43-167) <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>
7. Pérez, C., Pérez, A., Coscelli, G., y col. (2015) Identificación de infecciones digestivas en conejos: Orientaciones para optimizar la prevención y control. *Cogal*, p.26-31. Consultado el 23 de abril del 2024 en <http://cogal.net/pdf/2015.pdf>

8. Solans, L., Arnal, J.L., Sanz, C., y col. (2019). Rabbit Enteropathies on Commercial Farms in the Iberian Peninsula: Etiological agents identified in 2018-2019. *Animals (Basel)*, 9(12), p.1142. <https://doi.org/10.3390/ani9121142>
9. Gracia, E., Baselga, R., Fernández, A., Albizu, I., Villa, A. (2004). Etiología de las diarreas en conejos. *Boletín de cunicultura*, 131, p.20-26. Consultado el 23 de abril del 2024 en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2869799>
10. Sánchez, E., Selva, L. (2020). Patologías digestivas del conejo. *Boletín de cunicultura*, 195, p.27-31. Consultado el 22 de abril del 2024 en https://asescu.com/wp-content/uploads/2020/03/195Sanidad_Bioseguridad.pdf
11. Romer, C. (2008). La importancia de la cecotrofia en el conejo. *Boletín cunicultura*, 156, p.53-56. Consultado el 23 de abril de 2024 en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2933415>
12. Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J. (1993). Boletín de cunicultura. Colibacilosis en conejos: vacunas. *Boletín de cunicultura*, 68, p.18-23. Consultado el 23 de abril del 2024 en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2869191>
13. Chust, O.R., Gómez, P.J.M., Selva, M.L. (2021). Colibacilosis en gazapos. *Boletín cunicultura*, 199, p.30-31. Consultado el 26 de abril del 2024 en <https://asescu.com/wp-content/uploads/2021/03/199SanidadBioseguridad2.pdf>
14. Alonso, A.C, Manrique, T.C., dir. (2018). *Epidemiología molecular en Escherichia coli procedente de fauna salvaje: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética*. Tesis. Universidad de La Rioja: Facultad de Ciencia y Tecnología. Consultado el 6 de junio en <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/221324.pdf>
15. Cantey, J.R., Blake, R.K. (1997). Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect Dis.*, 135(3), p.454-462. <https://doi.org/10.1093/infdis/135.3.454>
16. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, L.T.(2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), p.123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

17. Martín, S.S. (2020). *Identificación y caracterización de E. coli aisladas de conejos con sintomatología diarreica*. Valladolid: Facultad de Medicina. Consultado el 7 de junio en <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/42209/TFG-M-N2031.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
18. Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., y col. (1997). Prevalence and Characteristics of Enteropathogenic *Escherichia coli* with the eae Gene in Diarrhoeic Rabbits. *Microbiol. Immunol.*, 41(2), p.77-82. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01185.x>
19. Penteadó, A.S., Ugrinovich, L.A., Blanco, J., y col. (2002). Serobiotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *ELSEVIER*, 89(1), p.41-51. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00148-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00148-7)
20. Kauffmann, F. (1947). The serology of the coli Group. *J.Immunol.*, 57(1), p.71-100. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.57.1.71>
21. Ørskov, F., Ørskov, I. (1984). 2 serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*, 14, p.43-112. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70447-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70447-1)
22. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010). The population genes of commensal. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), p.207-17. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
23. Enright, M.C., Spratt, B.G. (1999). Multilocus Sequence Typing. *Trends in Microbiology*, 7, p.482-487. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01609-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01609-1)
24. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.D. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.*, 5(1), p.58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
25. Clermont, O., Dixit, O., Vangchhia, B., y col. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ. Microbiol. Rep.*, 21(8), p.3107-3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>

26. Clermont, O., Condamine, B., Dion, S., Gordon, D.M., Denamur, E. (2021). The E phylogroup of *Escherichia coli* is highly diverse and mimics the whole *E. coli* species population structure. *Environ. Microbiol. Rep.*, 23(11), p.7139-7151. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15742>
27. Gordon, D.M., Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology Society*, 149(12). <https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0>
28. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, p.207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
29. Real Decreto 666/2023, de 18 de julio, por el que se regula la distribución, prescripción, dispensación y uso de medicamentos veterinarios. (BOE núm.172, 20.07.2023, p.1-47) <https://www.boe.es/eli/es/rd/2023/07/18/666/con>
30. Reglamento Delegado (UE) 2024/1159 de la Comisión, de 7 de febrero de 2024, por el que se completa el Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo mediante el establecimiento de normas sobre las medidas adecuadas para garantizar el uso seguro y eficaz de los medicamentos veterinarios autorizados y prescritos para su administración oral por vías distintas de los piensos medicamentosos y administrados por el responsable de los animales a los animales productores de alimentos (DOUE 1159, 19.04.2024,p.1-7) http://data.europa.eu/eli/reg_del/2024/1159/oj
31. Reglamento delegado (UE) 2023/905 de la Comisión, de 27 de febrero de 2023, por el que se completa el Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la aplicación de la prohibición de utilizar determinados medicamentos antimicrobianos en animales o productos de origen animal exportados desde terceros países a la Unión. (DOUE 116, 04.05.2023, p.1-6) http://data.europa.eu/eli/reg_del/2023/905/oj
32. Organización Mundial de la Salud. (2017). Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos: reseña de política. Organización Mundial de la Salud, p.1-8. Consultado el 24 de abril del 2024 en <https://iris.who.int/handle/10665/259384>

33. Organización Mundial de la Salud. (2024). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024. *Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. Consultado el 28 de abril del 2024 en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
34. Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. Biol. Sci. Royal Society*, 289(1036), p.321-331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
35. Hall, G.B., Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (6), p.1050–1051. <https://doi.org/10.1093/jac/dki130>
36. Torres, C., Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades infecciosas y microbiología Clínica*, 25(2), p.29-37. Consultado el 8 de junio en <https://www.elsevier.es/en-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-english-428-pdf-13112086>
37. García, A., Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B., Campoy, S., Coll, P. (2005). Characterization of the highly variable region surrounding the blaCTX-M-9 gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56, p. 819-826. <https://doi.org/10.1093/jac/dki345>
38. Agencia Europea de Medicamentos, EMA (2020). Categorisation of Antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal Health. Consultado el 24 de mayo del 2024 en <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-and-animal-health>
39. Zhao, X., Yang, J., Ju, Z., Chang, W., Sun, S. (2018). Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Rabbit Farms in Taiwan, China. *BioMed Research International*, 1, p.7. <https://doi.org/10.1155/2018/8607647>
40. Freitas-Silva, J., Inácio, Â.S., Mourão, J., y col. (2018). Occurrence of mcr-1 in *Escherichia coli* from rabbits of intensive farming. *Veterinary Microbiology*, 227, p.78-81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.020>
41. Mohamed, M.S., Sawsan, Kh.E., Madiha, S.I. (2019). Detection of Diarrheogenic *Escherichia Coli* in Rabbits. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 61(2), p.137-143. <https://doi.org/10.5455/ajvs.45817>

42. Chai, M.H., Sukiman, M.Z., Jasmy, N., y col. (2022). Molecular Detection and Antibigram of ESBL-Producing and Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* from Rabbit, Swine, and Poultry in Malaysia. *T.A.S.J.*, 1(45), p.16-23. <https://doi.org/10.5398/tasj.2022.45.1.16>
43. Massella, E., Giacometti, F., Bonilauri, P., Reid, C.J., Djordjevic, S.P., Merialdi, G., Bacci, C., Fiorentini, L., Massi, P., Bardasi, L., y col. (2021). Antimicrobial Resistance Profile and ExPEC Virulence Potential in Commensal *Escherichia coli* of Multiple Sources. *Antibiotics*, 10(4), p.351. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040351>
44. Silva, A., Silva, V., Tavares, T., López, M., Patricia, P., y col. (2024). Rabbits as a Reservoir of Multidrug-Resistant *Escherichia coli*: Clonal Lineages and Public Health Impact. *Antibiotics*, 13(4), p.376. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040376>
45. García-Meniño, I., García, García ., Gómez, V., Jiménez, M., Mora, A., , y col. (2022). Mobile colistin resistance (MCR), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and multidrug resistance monitoring in *Escherichia coli* (commensal and pathogenic) in pig farming: need of harmonized guidelines and clinical breakpoints. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.10426121>
46. Díaz-Jiménez, D., García, I., Herrera, A., Lestón, L., Mora, A. (2021). Microbiological risk assessment of Turkey and chicken meat for consumer: Significant differences regarding multidrug resistance, mcr or presence of hybrid a EPEC/ExPEC pathotypes of *E. coli*. *Food Control*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107713>
47. Meniño, I.G., Gutiérrez, M.A., dir.; ÁLVAREZ, B.J., dir. (2019). *Estudio del grupo clonal pandémico ST131 de Escherichia coli y de cepas enteropatógenas porcinas (ETEC, VTEC, ETEC/VTEC y AEPEC) resistentes a colistina*. Tesis. Santiago de Compostela: Facultad de veterinaria.
48. Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., y col. (2011). Characteristics of the Shigatoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 14(3), p.121-141. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.142>

49. Gómez-Duarte, O.G., Arzuza, O., y col. (2010). Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), p. 199-206. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0355>
50. Pérez Pérez, F.J., Hanson, N.D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), p.2153-2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>
51. Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M.P., y col. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4), p.506-512. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.007>
52. Saladin, M., Cao, T.B., Lambert, y col. (2002). Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), p.161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x>
53. Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., y col. (2000). Salmonella enterica serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 38(12), p.4676-4678. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.12.4676-4678.2000>
54. Liu, Y.Y, Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., y col. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animal and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.*, 16, p.161-168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
55. Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhul, R., Malhotra-Kumar, S., Butaye, P., Goosens, H., y col. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium 2016. *Eurosurveillance*, 21(27). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>
56. Rebelo, A.R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J.S., y col. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 23(6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>

57. Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., y col. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain, and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
58. Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., y col. (2017). Identification as a novel transposon associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother*, 72, p.3317-3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
59. García, M.I., García, V., Mora, A., Díaz, J.D., Flament S.C., Alonso, M.P., y col. (2018). Swine enteric colibacillosis in Spain: Pathogenic Potential of *mcr-1* ST10 and ST131 *E. coli* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02659>
60. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., y col. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18(3), p.268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
61. Clausen, P.T., Zankari, E., Aarestrup, F.M., Lund, O. (2016). Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. *J. Antimicrob. Chemother*, 71(9), p.2484-2488. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw184>
62. Clausen, P.T., Aarestrup, F.M., Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>
63. Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Llagostera, M., y col. (2006). ESBL- and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig, and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, 118, p.299-304. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.08.002>
64. Logan, L.K., Medernach, R.L., Domitrovic T.N., y col. (2019). The Clinical and Molecular Epidemiology of CTX-M-9 Group Producing Enterobacteriaceae Infections in Children. *Infect. Dis. Ther.*, 8(2), p.243-254. <https://doi.org/10.1007/s40121-019-0237-2>
65. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Ministerio de Sanidad, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2022). Plan reduce porcino. PRAN. Consultado el 27 de abril del 2024 en [Programa REDUCE porcino](#).