UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Identificación y caracterización de bacterias resistentes a colistina procedentes de animales de abasto en España. Evaluación de su persistencia y posible diseminación

Identification and characterization of colistin resistant bacteria from food-producing animals in Spain. Assessment of its persistence and possible dissemination

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pedro Miguela Villoldo

DIRECTORES

Lucas José Domínguez Rodríguez
Miguel Ángel Moreno Romo
María Ugarte Ruiz

© Pedro Miguela Villoldo, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



DOCTORADO EN VETERINARIA

TESIS DOCTORAL

Identificación y caracterización de bacterias resistentes a colistina procedentes de animales de abasto en España. Evaluación de su persistencia y posible diseminación

Identification and characterization of colistin resistant bacteria from food-producing animals in Spain. Assessment of its persistence and possible dissemination

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Pedro Miguela Villoldo

DIRECTORES

Dr. Lucas José Domínguez Rodríguez
Dr. Miguel Ángel Moreno Romo
Dra. María Ugarte Ruiz

Madrid, 2023



Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

Universidad Complutense de Madrid

D. Lucas Domínguez Rodríguez, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid; D. Miguel Ángel Moreno Romo, Catedrático jubilado del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid; y Dña. María Ugarte Ruiz, Doctora del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET de la de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral que lleva por título “Identificación y caracterización de bacterias resistentes a colistina procedentes de animales de abasto en España. Evaluación de su persistencia y posible diseminación. Identification and characterization of colistin resistant bacteria from food-producing animals in Spain. Assessment of its persistence and possible dissemination” ha sido realizada por el graduado en Biología D. Pedro Miguela Villoldo en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria y el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor con Mención Internacional por la Universidad Complutense.

Madrid, 2023

Fdo. Lucas Domínguez Rodriguez

Fdo. Miguel Ángel Moreno Romo

Fdo. María Ugarte Ruiz

Doctorado con mención internacional

La presente Tesis Doctoral cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Complutense de Madrid para obtener la mención de Doctor Internacional:

1. Realización de una estancia mínima de tres meses en una institución de enseñanza superior o centro de investigación fuera de España:
    - Centro receptor: London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), London, United Kingdom.
    - Investigador principal: Dr. Ozan Gundogdu
    - Duración: 3 meses (21/09/2021 – 18/12/2021).
2. El contenido del resumen y las conclusiones de la presente Tesis Doctoral, ha sido redactado en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en su campo de conocimiento, distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España (inglés).
3. La Tesis Doctoral ha sido evaluada por dos expertos doctores pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación no español.
4. El tribunal evaluador de la tesis está compuesto por, al menos, un experto perteneciente a alguna institución de educación superior o instituto de investigación no español.



Proyectos, contratos y becas de investigación

El trabajo de Tesis Doctoral que se presenta a continuación se ha realizado en el marco de los siguientes proyectos, contratos y becas de investigación:

- Contrato de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación. Referencia de la ayuda BES-2017-080264.

Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad:

- Bacterias resistentes a colistina, el antimicrobiano de último recurso cuya utilización en animales de granja supone un nuevo reto para la Seguridad Alimentaria (RESCOL). Referencia del proyecto: AGL2016-74882-C3-1-R (contratado FPI en el subproyecto 1).

- Reducción de la Resistencia a los Antimicrobianos en enterobacterias zoonóticas (REDAMR). Referencia del proyecto: PID2020-118405RB-I00 (miembro del equipo de trabajo).

A Laura y Noa.

A mis padres y mi hermana.

Agradecimientos

Con estas líneas llego al final de una importante etapa de mi vida. Durante estos años he disfrutado de un trabajo motivante a la par que exigente, que me ha permitido aprender y formarme como investigador. Ha sido un camino duro, lleno de momentos en los que las fuerzas flaqueaban, en los que la frustración y el cansancio se adueñaban de mí, haciendo difícil mantener la motivación con que empecé este reto. Aunque exhausto, llego al final de esta "carrera de fondo" feliz, satisfecho y orgulloso del trabajo realizado, de las experiencias vividas y de las competencias que he adquirido. Sin embargo, no todo es ciencia, y en este periodo tienen un papel importante todas las personas que me han acompañado, que me han ayudado tanto laboral como emocionalmente, que me han motivado cuando algo salía mal, que me han hecho reír cuando las cosas se torcían, que me han ayudado a desconectar cuando era preciso y que han hecho ameno y divertido cada minuto invertido en esta tesis doctoral. Muchos y muy buenos momentos que debo agradeceros a cada uno de vosotros.

En el ámbito institucional, debo agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por la financiación del contrato FPI que me ha permitido realizar la presente tesis doctoral; al Ministerio de Economía y Competitividad por financiar el proyecto al que se encuentra ligada la concesión del contrato FPI; a los equipos de trabajo de los doctores Alberto Quesada, de la Universidad de Extremadura, David Rodríguez, de la Universidad de Burgos y Marta Hernández, del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, por su estrecha colaboración y asesoramiento en los diferentes trabajos que componen la presente tesis doctoral.

En la parcela personal, me gustaría comenzar por mis directores, Lucas, María y Miguel Ángel, quienes me han brindado la oportunidad de desarrollarme como investigador y que han depositado su total confianza en mí, haciendo este periodo más sencillo. Me llevo para el recuerdo aquellas reuniones donde se confrontaban ideas, en un principio contrarias, acababan surgiendo divertidos momentos. Las mismas en las que entraba con una idea armada y acababa saliendo con otra totalmente distinta y cuatro veces más trabajo de lo que tenía planificado al inicio de la reunión… aunque gracias a esto se ha logrado un trabajo muy completo. En definitiva, sois responsables de gran parte del éxito de esta tesis. Gracias por vuestro apoyo y dedicación, considero un verdadero privilegio haberos tenido como directores.

A continuación me gustaría destacar el excelente equipo de trabajo con el que me encontré al llegar a VISAVET. Esta tesis hubiera sido mucho más compleja y, por qué no decirlo, aburrida de

no haber contado con la ayuda de María G., Nis y Fany. Gracias por vuestro apoyo durante estos años, por momentos de risas entre pilas de placas que auguraban que la hora de comer podría tomarse como merienda. No me puedo olvidar de Irene, Celia, Esther, Estefi, Silvia y Claudia, que en su paso por el servicio también me han sacado de algún que otro apuro cuando el trabajo me desbordaba y han contribuido a un ambiente inmejorable y divertido. He tenido la gran suerte de pertenecer al Servicio de ZTA y os estoy tremendamente agradecido. Siento que más allá de unas excelentes compañeras, me llevo grandes amigas.

Debo mencionar también a Irene, Javi y Vicente, grandes compañeros y amigos, con los que entre café y café y puede que alguna caña, hemos olvidado por momentos la presión del trabajo con risas y mucho "sinsentido", llevándome grandes amigos. Gracias por vuestra ayuda, consejos y desvaríos.

En VISAVET me he encontrado con un equipo inmejorable. No puedo nombraros a todos ya que entonces esta sección tendría más páginas que el cuerpo de la tesis. Os estoy muy agradecido a todos vosotros por el tremendo ambiente de trabajo que creáis y que hace de este centro un lugar ideal para trabajar.

Me gustaría incluir entre los agradecimientos al Dr. Ozan Gundogdu, responsable de la estancia que realicé en el Reino Unido. Inmejorable anfitrión, que me hizo sentir parte de su equipo desde el primer día. *Thank you for your hospitality, for sharing your hobbies with me and for everything you taught me about your city.*

Más allá de las puertas del laboratorio, hay muchas personas en mi círculo personal que me han ayudado a mantenerme firme y alcanzar esta meta. Tengo la fortuna de contar con un grupo de amigos inmejorable, que se han mantenido cerca de mí desde que la Biología nos unió en aquellos primeros cursos de la carrera. Diego, Pily, Guille, Laura, Pablo, Mario, Elena, y, por supuesto, todos los que habéis llegado después contribuyendo cada uno con su locura a un grupo dispar, al que me siento muy orgulloso de pertenecer. Sé que puedo contar con vosotros para cualquier cosa y eso es una gran red de seguridad para cualquier reto que afronte en mi vida. Gracias.

Para el final he dejado a las personas más importantes, mi familia. Empezando por mis padres, Evelyn y Pedro, y mi hermana, Vero. Ellos son mis mayores ejemplos de superación y resiliencia, de perseverar aunque vengan mal dadas y salir adelante con éxito y felicidad. Con ejemplos así, las dificultades que se han presentado durante el transcurso de la tesis han sido mucho más fáciles de superar. Gracias a todo vuestro apoyo y cariño, así es muy fácil alcanzar cualquier objetivo.

Y, para finalizar, mi pilar fundamental, Laura. Sin tu continuo apoyo y motivación, todo este proceso hubiera sido mucho más costoso. Gracias por tu alegría, por aguantar mis frustraciones y por impulsarme cada día a alcanzar mis metas. Más allá del apoyo laboral, considero fundamental el emocional y tú has sabido qué decir y qué hacer en los momentos más difíciles, por lo que, gran parte de mi éxito, es también tuyo. Gracias.

Antes de terminar con esta sección, debo hacer especial mención a mi hija Noa, que con apenas unos meses y sin saber pronunciar aún palabra alguna, ha sido capaz de sacarme una sonrisa en momentos de agobio y ha sido una gran motivación para terminar esta última etapa de la tesis.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

I. Listado de tablas 25

II. Listado de figuras 29

III. Listado de abreviaturas 31

IV. Resumen 33

V. Summary 37

1. Introducción 41

1.1. Resistencia a antimicrobianos 41

1.2. Polimixinas 42

1.3. Historia de la colistina y su empleo en medicina humana y veterinaria 42

1.4. Estructura y mecanismo de acción de la colistina 44

1.5. Resistencia a colistina 48

1.5.1. Resistencia adquirida 48

1.6. Distribución de los genes de la familia *mcr* 55

1.7. Entorno genético de los genes *mcr* 55

1.8. Estrategias de control de la resistencia a colistina 56

1.8.1. Estrategias europeas de control de la resistencia a colistina 57

1.8.2. Estrategias nacionales de control de la resistencia a colistina 58

2. Objetivos 61

3. Material y métodos 63

3.1. Material 63

3.1.1. Cepario RESCOL: bacterias resistentes a colistina de la colección VISAVET-UCM . 63

3.1.2. Cepario COLR: Muestras de ganado porcino 65

3.2. Métodos 68

3.2.1. Métodos de cultivo, aislamiento e identificación 68

3.2.2. Caracterización molecular 72

3.2.3. Secuenciación completa del genoma 77

3.2.4. Estudio experimental: análisis de la capacidad de diseminación de las cepas resistentes a colistina portadoras del gen *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina 82

3.3. Análisis estadístico 87

4. Resultados 89

4.1. Caracterización de aislados resistentes a colistina 89

4.1.1. Cepario RESCOL 89

4.1.2. Cepario COLR: muestreos realizados en ganado porcino 93

4.2. Detección y cuantificación directa del gen *mcr-1* en muestras de ganado porcino 106

4.2.1. Calibración de la técnica de PCR SYBR Green a tiempo real para la cuantificación del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal 106

4.2.2. Comparación de resultados de la cuantificación del gen *mcr-1* mediante qPCR en muestras frescas y tras su congelación 107

4.2.3. Detección y cuantificación del gen *mcr-1* en muestras de ganado porcino recogidas en un espacio temporal de 23 años 108

4.3. Influencia del proceso de congelación de muestras de contenido cecal en las poblaciones bacterianas resistentes a colistina 111

4.3.1. Variación de la abundancia y diversidad de géneros bacterianos identificados en muestras frescas y tras su congelación 111

4.3.2. Detección molecular de genes *mcr* en aislados obtenidos mediante cultivo bacteriano en muestras frescas y congeladas 113

4.3.3. Comparación de los resultados de detección del gen *mcr-1* mediante cultivo bacteriano + PCR convencional y qPCR en muestras congeladas 116

4.4. Análisis de la localización genómica de los genes *mcr* y de su entorno genético 117

4.4.1. Plásmidos de tipo IncX4 119

4.4.2. Plásmidos de tipo IncHI2 124

4.4.3. Plásmidos de tipo ColE10 127

4.4.4. Plásmido de tipo IncX1 129

4.4.5. Plásmido de tipo IncHI1 131

4.4.6. Otros plásmidos 133

4.4.7. Genes *mcr* localizados en el cromosoma bacteriano 137

4.5. Evolución temporal de los plásmidos portadores de genes *mcr* 138

4.6. Estudio experimental de la capacidad de diseminación de aislados resistentes a colistina portadores del *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina 140

4.6.1. Recuento de *Salmonella* spp. en placa 140

4.6.2. Cuantificación directa en heces del gen *mcr-1* por qPCR 142

4.6.3. Cuantificación de *Salmonella* spp. mediante qPCR y análisis de su relación con la detección del gen *mcr-1* usando qPCR 144

5. Discusión 147

5.1. Caracterización fenotípica y molecular de enterobacterias resistentes a colistina 147

5.2. Localización y entorno de los genes *mcr* 153

5.3. Efectos de la congelación de muestras 162

5.4. Resistencia a colistina asociada a genes *mcr* y su relación con las ventas de polimixinas en España 164

5.5. Estudio experimental de la capacidad de diseminación de aislados resistentes a colistina portadores del *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina 168

6. Conclusiones 171

7. Conclusions 173

8. Referencias 175

Anexos 205

Anexo I: Características de los cebadores empleados en los diferentes ensayos de PCR. 207

Tabla I. Cebadores usados para la detección por PCR del gen *uidA* para la identificación de la especie *E. coli.* 208

Tabla II. Cebadores usados para la detección de genes de resistencia por PCR. 208

Tabla III. Cebadores para la detección del gen de resistencia a colistina *mcr-1* por PCR a tiempo real. 209

Anexo II. Distribución de los valores de CMI frente a los antimicrobianos incluidos en el panel de sensibilidad por año y especie bacteriana 211

Tabla IV. Distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antimicrobiano por especie bacteriana en los aislados del cepario RESCOL. 212

Tabla V. Distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antimicrobiano por especie bacteriana en los aislados del cepario COLR. 218

Anexo III. Distribución de los perfiles de resistencia por año y especie bacteriana 229

Tabla VI. Distribución de los perfiles de resistencia por especie bacteriana de los aislados del cepario RESCOL. 230

Tabla VII. Distribución de los perfiles de resistencia por especie bacteriana de los aislados del cepario COLR. 239

Anexo IV. Distribución de los resultados de cuantificación por qPCR a tiempo real del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal de ganado porcino por año de muestreo 255

Anexo V. Distribución de datos del estudio experimental de la capacidad de diseminación de aislados resistentes a colistina portadores de *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina 275

Tabla VIII. Distribución de los datos de los animales por grupo de animales y día de muestreo. 276

Tabla IX. Distribución de la cuantificación por qPCR a tiempo real del gen *mcr-1* en muestra directa de contenido cecal de pollos por grupo de animales y día de muestreo. 279

Tabla X. Distribución de la cuantificación por qPCR a tiempo real de *Salmonella* spp. en muestra directa de contenido cecal de pollos por grupo de animales y día de muestreo.. 282

Tabla XI. Distribución de los resultados del recuento de *Salmonella* spp. en placa por grupo de animales y día de muestreo. 284

Anexo VI. Trabajos publicados 287

I. Publicaciones derivadas del trabajo de tesis 287

II. Participación en otros trabajos relacionados con la tesis 329

III. Publicaciones en congresos nacionales e internacionales 329

IV. Participación en otros trabajos 330

I. LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Distribución por año de aislamiento y tipo de muestra de los 163 aislados bacterianos del cepario RESCOL 64

Tabla 2: Distribución de las muestras analizadas (cerdos de capa blanca procedentes de los muestreos del Programa de Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos en animales sanos) 66

Tabla 3: Antimicrobianos y rango de concentraciones incluidos en los paneles de microdilución EUVSEC y EUVSEC2 70

Tabla 4: Distribución por especies de los aislados secuenciados en QI (secuenciación de lectura corta y larga) en función de la presencia de genes de la familia *mcr* 81

Tabla 5: Distribución por muestra y especie animal de los 80 aislados del cepario RESCOL obtenidos mediante el protocolo MCK-COL 89

Tabla 6: Distribución de los valores de CMI frente a colistina de los 243 aislados que componen el cepario RESCOL 90

Tabla 7: Detección de genes de la familia mcr en los aislados resistentes a colistina del cepario RESCOL (N = 243) 93

Tabla 8: Distribución de muestras de contenido cecal de ganado porcino según el número de morfologías que presentaban las colonias bacterianas observadas en medio de cultivo COLR y el año de muestreo 94

Tabla 9: Especies bacterianas resistentes a colistina aisladas a partir de muestras de contenido cecal de ganado porcino 95

Tabla 10: Distribución de los valores de CMI frente a los 14 antimicrobianos incluidos en la prueba de sensibilidad de los 475 aislados de *E. coli* procedentes de las muestras de ganado porcino 97

Tabla 11: Distribución de los valores de CMI frente a los 14 antimicrobianos incluidos en la prueba de sensibilidad de los 27 aislados de *K. pneumoniae* procedentes de las muestras de ganado porcino 99

Tabla 12: Especies bacterianas de los aislados ACRB resistentes a colistina (N = 554) obtenidos a partir de muestras de contenido cecal de ganado porcino y detección de genes de la familia *mcr* 101

Tabla 13: Distribución de los valores de CMI frente a colistina de los aislados de *E. coli* con CMI ≥2 mg/L en función de la presencia o ausencia de genes de resistencia de la familia *mcr*..... 102

Tabla 14: Distribución de los valores de CMI frente a colistina de los aislados de *K. pneumoniae* en función de la detección de genes de la familia *mcr*..... 103

Tabla 15: Distribución de los valores de CMI frente a colistina del resto de especies bacterianas en función de la detección de genes de la familia *mcr*..... 104

Tabla 16: Comparación de los resultados de detección por qPCR del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal frescas y tras su congelación 108

Tabla 17: Resultados de la cuantificación de *mcr-1* mediante qPCR SYBR Green en los muestreos de cerdos destinados a la producción de alimentos en España 109

Tabla 18: Análisis descriptivo anual de la cuantificación del gen *mcr-1* en muestras positivas de cerdos destinados a la producción de alimentos en España 110

Tabla 19: Comparación del crecimiento/ausencia de bacterias resistentes a colistina en muestras frescas y tras su congelación (n = 272) 111

Tabla 20: Géneros bacterianos detectados en muestras frescas y tras su congelación 113

Tabla 21: Distribución de genes *mcr* (*mcr-1* a *-5*) por especie bacteriana y tipo de muestra..... 114

Tabla 22: Distribución de aislados portadores de genes *mcr* en función de su CMI frente a la colistina obtenidos tanto en muestras frescas como congeladas 115

Tabla 23: Distribución conjunta de los resultados de detección del gen *mcr-1* por métodos basados en cultivo bacteriano, confirmado por PCR convencional, y mediante qPCR SYBR Green en muestras congeladas 116

Tabla 24: Localización conjunta de genes *mcr* en aislados de *E. coli* (n = 4) 117

Tabla 25: Distribución de los tipos de plásmidos encontrados en los 123 aislados en función de su potencial transmisibilidad y del tipo de *mcr* que albergaban 118

Tabla 26: Resultados del recuento de *Salmonella* spp. por día de vida.....140

Tabla 27: Resultados de la cuantificación mediante qPCR del gen *mcr-1* por día de vida 142

Tabla 28: Valores *p* derivados de la Prueba T obtenidos del análisis comparativo de la cuantificación del gen *mcr-1* y de *Salmonella* spp 146

II. LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de colistina A y B.....45

Figura 2: Estructura del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas 47

Figura 3: Elementos involucrados en la modificación del LPS en bacterias Gram negativas.....
.....49

Figura 4: Acción del sistema de doble componente *crrA/B* sobre el resto de los elementos modificadores del LPS de bacterias Gram negativas.....50

Figura 5: Principales elementos modificadores del LPS en bacterias Gram negativas, incluyendo tanto componentes cromosómicos como plasmídicos.....51

Figura 6: Porcentajes de homología entre las diferentes variantes de la familia MCR 54

Figura 7: Diseño del ensayo de validación del protocolo para la detección de *mcr-1* en muestras de contenido cecal 76

Figura 8: Diseño experimental del ensayo *in vivo* en broilers.....83

Figura 9: Cuantificación del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal frescas y tras su congelación
.....107

Figura 10: Distribución anual de la abundancia de *mcr-1* en muestras positivas (contenido cecal de cerdos destinados a la producción de alimentos en España) 110

Figura 11: Reconstrucción de un plásmido IncX4 120

Figura 12: Relación de secuencias de inserción (IS) de tipo IS*26* que flanquean a los genes *mcr* y su entorno genético en plásmidos IncX4 122

Figura 13: Relación de secuencias de inserción diferentes a IS*26* que flanquean a los genes *mcr* y su entorno genético en plásmidos IncX4 123

Figura 14: Reconstrucción del plásmido IncHI2 126

Figura 15: Reconstrucción del plásmido ColE10 128

Figura 16: Reconstrucción del plásmido IncX1.....130

Figura 17: Reconstrucción del plásmido IncHI1 132

Figura 18: Reconstrucción del plásmido IncP 134

Figura 19: Reconstrucción del plásmido IncY 135

Figura 20: Entorno genético de los genes *mcr* en plásmidos no identificados 136

Figura 21: Entorno genético del gen *mcr-1.1* en el cromosoma bacteriano 137

Figura 22: Evolución de la localización de los genes *mcr* entre 2003 y 2021 en muestras de contenido cecal de origen porcino 138

Figura 23: Resultados del recuento de *Salmonella* spp. en placa durante 21 días en muestras de contenido cecal de pollos 141

Figura 24: Resultados de la cuantificación mediante qPCR del gen *mcr-1* obtenidos por día de vida en los diferentes grupos del ensayo 143

Figura 25: Comparación entre resultados de qPCR para *Salmonella* spp. y el gen *mcr-1* obtenidos en los grupos de animales expuestos a *Salmonella* spp. (G3 y G4) 145

Figura 26: Evolución conjunta del porcentaje de muestras positivas mediante qPCR al gen *mcr-1* y de las ventas de polimixinas para uso veterinario en España 166

III. LISTADO DE ABREVIATURAS

Concepto	Abreviatura
ACRB	*Acquired colistin resistance bacteria*
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
AMEG	*Antimicrobial Advicead hoc Expert Group*
APEC	*E. coli* aviar patógena
AS	Agar Sangre
BHI	*Brain-Heart Infusion broth*
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
CAESAR-Net	*Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance Network*
CE/EC	Comisión Europea/European Commission
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COLR	Cepario de aislados resistentes a colistina confeccionado durante la tesis doctoral
CS	Sulfato de colistina
CSM	Colistimetato de sodio
CT	*Cycle Threshold*
CVMP	Comité para el Uso Veterinario de Productos Medicinales
E	Eficiencia de PCR
EARS-Net	*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*
ECDC	*European Centre for Disease Prevention and Control*
ECOFF	*Epidemiological cut-off values*
EMA	*European Medicines Agency*
EptA	Fosfoetanolamin transferasa
ESVAC	*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*
EUCAST	*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
H’	Índice de Shannon-Weaver
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
IS	Secuencia de inserción
ISO	*International Organization for Standardization*
ITACyL	Instituto Tecnológico Agrónomo de Castilla y León
Kdo	Ácido 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonico
Lact-	No fermentador de lactosa
Lact+	Fermentador de lactosa
L-Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinose
LPS	Lipopolisacárido

Concepto	**Abreviatura**
LSHTM	*London School of Hygiene and Tropical Medicine*
MALDI	*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MCK-COL	Agar MacConkey suplementado con colistina
MDR	Bacterias multirresistentes
MPF	*Mate-pair formation*
NaCl	Cloruro sódico
NCB3	Laboratorio de nivel 3 de contención biológica
NCRB	*Naturally colistin resistance bacteria*
OMS	Organización Mundial de la Salud
oriT	Origen de transferencia
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PCU	Population Correction Unit
PD	Farmacodinámica
PEtN	Fosfoetanolamina
Pfam	*Protein families database*
PK	Farmacocinética
pK/pD	Farmacocinética/farmacodinámica
PRAN	Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos
QI	*Quadram Institute*
qPCR	*Quantitative Polymerase Chain Reaction*
r^2	Coeficiente de determinación de PCR
Red VAV	Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antimicrobianos
RESCOL	Cepario de aislados resistentes a colistina preexistente al inicio de la tesis doctoral
SMID2	*ChromID selective medium Salmonella Agar*
SSF	Solución Salina Fisiológica
TOF	*Time-Of-Flight*
UCM	Universidad Complutense de Madrid
UE/EU	Unión Europea/European Union
UFC	Unidad formadora de colonias
VISAVET	Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria
XDR	Bacterias extremadamente resistentes
ZTA	Zoonosis de Transmisión alimentaria y Resistencia a Antibióticos
χ^2	Prueba de Chi-cuadrado

IV. RESUMEN

La colistina es un polipéptido catiónico en desuso como antibiótico desde la década de los setenta debido a su toxicidad, pero que fue reintroducido en medicina humana para tratar infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes, siendo categorizado como antimicrobiano de "último recurso". En medicina veterinaria la colistina se ha utilizado desde su descubrimiento para el tratamiento de infecciones en animales, especialmente las diarreas post-destete causada por *E. coli* en lechones y terneros o para el tratamiento de colibacilosis en aves.

Inicialmente, la resistencia a colistina parecía estar ligada exclusivamente a mutaciones en los genes de sistemas de doble componente *pmrA/B* y *phoP/Q*, localizados en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, en 2015 se describió por primera vez un gen de resistencia a colistina que se denominó *mcr-1* y que estaba localizado en un plásmido. Dado que la colistina era una de las pocas alternativas disponibles para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas multirresistentes y que la dispersión de este gen plasmídico podría aumentar exponencialmente debido a fenómenos de transferencia horizontal, la Agencia Europea del Medicamento (*European Medicines Agency,* EMA) recomendó en 2016 reducir el uso de colistina en animales.

La presente tesis doctoral, titulada "Identificación y caracterización de bacterias resistentes a colistina procedentes de diversos entornos de España. Evaluación de su persistencia y posible diseminación", se ha centrado en el estudio de enterobacterias resistentes a colistina desde diferentes enfoques fenotípicos y moleculares.

En la tesis se ha llevado a cabo el aislamiento y la caracterización fenotípica de bacterias resistentes a colistina y la detección molecular de los genes de la familia *mcr* asociados a la esta resistencia. A partir de aislados procedentes de animales, de alimentos de origen animal y agua recogida en una planta de tratamiento de efluentes urbanos, se aislaron enterobacterias resistentes a colistina, cuyo análisis fenotípico reveló niveles de resistencia moderados, situándose los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre 4 y 8 mg/L. La mayoría de los aislados mostraron resistencia, además, a otros antimicrobianos. La detección de genes *mcr* evidenció una frecuencia del gen *mcr-1* significativamente mayor que el resto de integrantes de la familia *mcr*. Aunque en menor proporción, se detectó también el gen *mcr-4* y, de forma ocasional, los genes *mcr-2* y *mcr-3*. Los genes *mcr* mostraron una distribución diferente según la especie bacteriana en la que se encontraban. La mayoría de aislados de *E. coli* albergaron genes *mcr*, siendo la variedad *mcr-1* la más frecuente. Las variantes *mcr-2* y *mcr-3* fueron detectadas

únicamente en esta especie. Sin embargo, la presencia de genes *mcr* no resultó ser tan común en bacterias como *Salmonella enterica* o *Klebsiella pneumoniae* que, aun siendo fenotípicamente resistentes a colistina, presentaron *mcr* en menos de la mitad de los aislados; o las especies del género *Enterobacter*, en la que ningún aislado mostró presencia de genes *mcr*.

Mediante técnicas de secuenciación masiva se llevó a cabo el estudio del entorno genético de los genes *mcr.* Este estudio reveló que la mayoría de genes *mcr-1* se encontraban en plásmidos conjugativos de tipo IncX4 e IncHI2, apareciendo en todos estos casos con el gen *pap2* en su entorno genético, mientras que los genes *mcr-4* solo se localizaron en plásmidos pequeños no conjugativos de tipo ColE10. Atendiendo a la línea temporal se pudo observar que entre 2006 y 2017 los genes *mcr* se encontraban mayoritariamente localizados en plásmidos conjugativos de pequeño tamaño (IncX4), mientras que los plásmidos portadores de *mcr* de mayor tamaño (IncHI2) comenzaron a aumentar su frecuencia a partir de 2010, alcanzando valores similares a IncX4 en 2018. Sin embargo, a partir de este año se observó otro cambio de tendencia caracterizado por el aumento del número de aislados que presentaban los genes *mcr* en el cromosoma bacteriano, alcanzando valores superiores a los localizados en plásmidos.

También se analizó el efecto que la congelación de muestras biológicas ejerce sobre la población de enterobacterias resistentes a colistina y sobre el gen *mcr-1* y las técnicas empleadas para su estudio, cultivo bacteriano en un caso y detección molecular por qPCR en el otro. La congelación de muestras de contenido cecal durante seis meses a -40 ^{o}C produjo una reducción del 84% en la viabilidad y diversidad de enterobacterias resistentes a colistina, mientras que los resultados de qPCR no se vieron alterados. Estos datos sugieren que las técnicas basadas en la detección del ADN son la mejor opción para para el estudio retrospectivo de la resistencia a colistina en muestras almacenadas en congelación, pudiendo ser complementadas con métodos basados en cultivo tradicional.

Con el propósito de estudiar la evolución del gen *mcr-1* a lo largo del tiempo se llevó a cabo su cuantificación por PCR cuantitativa directamente sobre las muestras de contenido cecal. Los resultados obtenidos evidenciaron una progresión ascendente de los niveles de *mcr-1* desde 2004 hasta 2015, año a partir del cual la cantidad del gen comenzó a descender hasta obtener en 2021 valores de cuantificación del gen similares a los observados en 2008. Este descenso coincidente con la limitación en el uso de colistina en animales, recomendada por la EMA y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), evidenció la relación existente entre ventas de polimixinas y resistencia a colistina asociada al gen *mcr-1*.

Por último, se evaluó la estabilidad y diseminación de cepas resistentes a colistina portadoras del gen *mcr-1* en un estudio *in vivo*, empleando *Salmonella enterica* como especie portadora del gen y pollos como modelo animal, para determinar el efecto que la administración de este antimicrobiano pudiera tener en la selección de cepas resistentes. De los cuatro grupos en que se dividió a los animales, en dos de ellos (G3 y G4) se puso en contacto a los pollos con la cepa bacteriana y dos quedaron libres. Asimismo, dos grupos fueron tratados con colistina durante siete días (G2 y G4), manteniendo por tanto un grupo libre tanto de tratamiento como de exposición a la bacteria portadora del gen (G1). Los resultados evidenciaron una mayor cuantificación de *mcr-1* en los grupos de animales inoculados con dicha bacteria, alcanzando antes (día 14) los niveles máximos en el grupo tratado con colistina (G4) con respecto al grupo no tratado (G3). Además, ambos grupos igualaron sus niveles de *mcr-1* en el día 21 de estudio y, sin embargo, redujeron los de *Salmonella* spp., indicando que el mantenimiento de los niveles de *mcr-1* podría deberse a fenómenos de transferencia horizontal entre bacterias intestinales.

V. SUMMARY

Colistin is a cationic polypeptide whose use as antibiotic was withdrawn since the 1970s because of its toxicity, but was reintroduced later in human medicine to treat infections caused by multi-resistant Gram-negative bacteria, being categorised as a "last resort antimicrobial". Colistin has been used in veterinary medicine since its discovery for the treatment of infections in animals, especially post-weaning diarrhoea caused by *E. coli* in piglets and calves and colibacillosis in poultry.

Traditionally, colistin was linked exclusively to chromosome mutations in the two-component systems genes pmrA/B and phoP/Q. However, in 2015, a colistin resistance gene, called *mcr-1*, was described for the first time on a plasmid. Since colistin was one of the few alternatives available for the treatment of multidrug-resistant Gram negative bacteria infections and the spread of this plasmid gene could increase exponentially due to horizontal transfer, the European Medicines Agency (EMA) recommended in 2016 a reduction in the use of colistin in animals.

This doctoral thesis, entitled "Identification and characterisation of colistin resistant bacteria from different environments in Spain. Persistence and possible dissemination assessment", has focused on the study of colistin resistant enterobacteria from different phenotypic and molecular approaches.

In this thesis, isolation and phenotypic characterisation of colistin resistant bacteria and molecular detection of the *mcr* family genes associated with colistin resistance were carried out. Colistin resistant *Enterobacteriaceae* were isolated from animals, food of animal origin and water collected from an urban effluent treatment plant. Phenotypic analysis revealed moderate levels of resistance, with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values ranging between 4 and 8 mg/L. Most isolates also showed resistance to other antimicrobials. The detection of *mcr* genes showed a significantly higher frequency of the *mcr-1* gene compared to other members of the *mcr* family. Other variants, such as *mcr-4* and, occasionally, *mcr-2* and *mcr-3,* were also detected, albeit in a lower proportion. The *mcr* genes showed a different distribution according to the bacterial species in which they were found. The majority of *E. coli* isolates harboured *mcr* genes, being the *mcr-1* the most frequent variant. The *mcr-2* and *mcr-3* genes were only detected in this species. However, the presence of *mcr* genes was not usual in bacteria such as *Salmonella enterica* or *Klebsiella pneumoniae* which had *mcr* in less than half of the isolates, in spite of being

phenotypically resistant to colistin, or in species of the genus *Enterobacter* spp., in which no isolates showed the presence of *mcr* genes.

This study revealed that the majority of *mcr-1* genes were located on IncX4 and IncHI2 conjugative plasmids, in all cases appearing with the *pap2* gene in their genetic environment, while *mcr-4* genes were only located on small non-mobilizable ColE10 plasmids. From a timeline perspective, it could be observed that *mcr* genes were mostly located in small conjugative plasmids (IncX4) from 2006 to 2017, while plasmids carrying larger *mcr* genes (IncHI2) started to become more frequent from 2010, reaching similar values to those of IncX4 by 2018. However, from this year, another change characterised by an increase in the number of isolates with *mcr* genes located in the bacterial chromosome was observed, reaching larger numbers than those located in plasmids.

The effect of freezing biological samples on the colistin resistant *Enterobacteriaceae* population and the *mcr-1* gene, as well as on the techniques used, bacterial culture and molecular detection by qPCR respectively, were also analysed. Freezing samples of caecal contents for six months at -40 ^{o}C reduced the viability and diversity of 84% of colistin-resistant *Enterobacteriaceae*, while qPCR results did not vary after treatment. These data suggest that techniques based on DNA detection are the best option for retrospective studies of colistin resistance in frozen stored samples and can be complemented by traditional culture-based methods.

The evolution of the *mcr-1* gene over time was assessed by quantitative PCR directly on samples of caecal contents. The results obtained showed an upward progression of *mcr-1* levels from 2004 to 2015, after which the quantity of the gene began to decrease up to 2021, when gene quantification values similar to those observed in 2008 were obtained. This decrease matched the reduction in the use of colistin in animals, recommended by the EMA and the *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* (AEMPS), demonstrating the relationship between polymyxin sales and colistin resistance associated with the *mcr-1* gene.

Finally, the stability and dissemination of colistin resistant strains carrying the *mcr-1* gene was evaluated by an *in vivo* study, to determine the effect that the administration of this antimicrobial could have on the selection of resistant strains, using *Salmonella enterica* as *mcr-1*-carrying bacteria and broiler chickens as animal model. The animals were divided in four groups, whereby two groups (G3 and G4) were challenged with the bacterial strain and two groups (G1 and G2) remained unchallenged. In addition, two groups were treated with colistin for seven days (G2 and G4), thus keeping one group free of both treatment and exposure to the *mcr-1* – carrying bacteria

(G1). The results showed a higher quantification of *mcr-1* in the groups of animals inoculated with the bacteria, reaching maximum levels earlier (day 14) in the colistin treated group (G4) than in the untreated group (G3). Furthermore, *mcr-1* levels were equal for both groups on day 21 of the study, albeit *Salmonella* spp. levels were reduced, indicating that the maintenance of *mcr-1* levels could be due to horizontal transfer phenomena between intestinal bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Resistencia a antimicrobianos

Entre 1928 y 1987 se descubrieron la mayoría de los antimicrobianos disponibles en la actualidad, que permitieron tratar todo tipo de infecciones de manera eficiente (1). Desafortunadamente, otro problema acompañaba al descubrimiento de nuevas moléculas terapéuticas, la resistencia a los antimicrobianos. De forma natural, las bacterias desarrollan estrategias adaptativas para luchar frente a las amenazas que rodean su entorno. Ante una presión selectiva, como puede ser un tratamiento antibacteriano, pueden seleccionarse los individuos de una población bacteriana capaces de resistir el efecto del antimicrobiano, y mientras la mayoría de componentes de la población sucumben a su efecto, éstos prosperan y terminan conformando una población bacteriana, mayoritaria y resistente a la molécula empleada (2). Así pues, a cada nuevo antimicrobiano le sucede la aparición de bacterias resistentes a su actividad, llegando a comprometer las terapias más comunes a la hora de tratar una infección. En la actualidad, la resistencia a antimicrobianos se ha convertido en un grave problema que compromete las terapias empleadas para tratar infecciones bacterianas (3, 4). La continua aparición de diferentes mecanismos de resistencia, junto a su rápida diseminación entre poblaciones bacterianas, el uso indebido de los antimicrobianos en medicina humana y veterinaria y la escasez de desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas, son los factores más importantes que han contribuido a que la resistencia a antimicrobianos sea una de las principales amenazas en la actualidad (4, 5). De acuerdo con el artículo publicado por Jim O'Neill en 2016, "*The review on antimicrobial resistance*", la resistencia a antimicrobianos era responsable de causar 700.000 muertes al año y mostraba una tendencia ascendente que podría llegar a causar alrededor de 10 millones de muertes al año, situándose como primera causa de muerte anual, por delante del cáncer en el año 2050 (6).

El filo Proteobacteria, especialmente las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, han jugado un importante papel en la emergencia y mantenimiento de la resistencia a los antimicrobianos, ya que muchos de los genes implicados se suelen encontrar con mayor frecuencia en este filo en comparación con otros filos del microbioma intestinal (7, 8).

1.2. Polimixinas

Las polimixinas son oligopéptidos cíclicos con actividad antimicrobiana, en los que se diferencian cinco tipos según su estructura molecular (polimixinas A, B, C, D y E), de los cuales, tan solo las polimixinas B y E (esta última también conocida como colistina) se comercializan tanto para su uso en personas como en medicina veterinaria (9-11). Se trata de moléculas catiónicas que tienen un amplio espectro de actividad. La polimixina B actúa principalmente sobre bacterias Gram negativas, aunque hay estudios que han observado cierto efecto sobre Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (12), *Streptococcus gordonii, Streptococcus agalactiae* (13) o *Listeria monocytogenes* (14). La colistina, en cambio, es especialmente activa sobre bacterias Gram negativas, siendo, en numerosas ocasiones, la opción más eficaz para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes (MDR), especialmente *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumanii*, pero también *E coli*, *K pneumoniae* y *Salmonella enterica* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y/o carbapenemasas (15, 16).

1.3. Historia de la colistina y su empleo en medicina humana y veterinaria

La colistina fue obtenida por primera vez en 1947 a partir de un cultivo de *Paenibacillus polymyxa* subsp. c*olistinus,* una bacteria ambiental Gram positiva que coloniza el suelo (17). Esta molécula se empezó a usar como tratamiento antimicrobiano en Japón y, posteriormente, su uso se extendió a Europa y a Estados Unidos en la década de los cincuenta (18). Este antimicrobiano fue administrado desde 1959 en medicina humana en dos formulaciones distintas: sulfato de colistina (CS) y metanosulfato de colistina o colistimetato (CMS), molécula microbiológicamente inactiva que en medio acuoso se hidroliza y se transforma en la molécula activa de colistina (19). La aplicación del CS se realiza por vía tópica para tratar infecciones de la piel u oral para la descontaminación del tracto digestivo, ya que la absorción de colistina en el tracto digestivo es prácticamente nula (20, 21). Por otra parte, la ruta de administración más común del CMS es la parenteral e intramuscular, aunque también se han descrito otras como la intratecal o intraventricular (11, 20, 22). En cuanto al tratamiento de infecciones producidas por bacterias MDR y extremadamente resistentes (XDR), algunos estudios han demostrado que la terapia combinada de colistina con otros antimicrobianos, como rifampicina, meropenem, ceftazidima,

ciprofloxacino, amikacina o trimetoprim/sulfametoxazol era más efectiva que la monoterapia, cobrando especial importancia en pacientes con fibrosis quística (23-26).

Sin embargo, uno de los principales efectos secundarios observados tras el empleo de colistina era su toxicidad en personas, destacando sus efectos nefrotóxicos y, en menor medida, neurotóxicos. A pesar de que la formulación del CMS como profármaco reducía la toxicidad que presentaba el CS, también disminuía su efecto antimicrobiano, siendo más habituales los efectos tóxicos cuando el CMS se administraba por vía parenteral (15). La frecuencia de los efectos neurotóxicos se encontraba en torno al 7%, pudiendo aumentar hasta el 29% en pacientes con fibrosis quística, mientras que la frecuencia de los efectos nefrotóxicos se situaba, por lo general, en valores entre el 14 y el 18%, dependiendo del estudio (10).

A principios de los setenta, debido a los efectos adversos observados y a la disponibilidad de otras alternativas terapéuticas, se redujo el uso parenteral de colistina (18), que fue reemplazada por antimicrobianos menos lesivos como los betalactámicos, los aminoglucósidos o las quinolonas, reduciéndose, de esta manera, su uso a las vías tópica y oftálmica (10, 20). Sin embargo, en la década de los noventa, la creciente detección de bacterias MDR, especialmente *P. aeruginosa*, *A. baumanii* y *K. pneumoniae*, unida a la escasez en el desarrollo de nuevos antimicrobianos, condujo a las autoridades sanitarias a reconsiderar el empleo de otros antimicrobianos que llevaban mucho tiempo fuera de uso, como es el caso de la colistina. En 2005, este fármaco fue catalogado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “antimicrobiano de elevada importancia” (27) y en 2013 redefinido como “antimicrobiano de importancia crítica” (28), ya que era prácticamente la única opción para tratar infecciones causadas bacterias MDR en personas (18, 29).

La colistina se ha empleado en medicina veterinaria desde la década de los cincuenta en diferentes especies como ganado porcino, bovino, ovino, caprino, así como en aves y conejos (20, 30). Su uso se ha centrado en el control de infecciones causadas por *E. coli* en sistemas de producción intensiva de cerdos y aves, sectores de la producción animal europea con más peso en los Estados Miembros (20, 31). La diarrea post destete es una enfermedad producida por *E. coli* que suele afectar a lechones durante el cambio de alimentación tras el destete. Esta enfermedad puede producir una mortalidad del 20 al 30%, traduciéndose en una de las principales causas de pérdida económica del sector porcino (32, 33). En el caso del sector avícola, la colibacilosis, enfermedad causada principalmente por *E. coli* aviar patógena (APEC), es responsable de grandes pérdidas económicas en todo el mundo, debido a la disminución de la producción, elevados costes de

tratamiento, rechazo de canales y mortalidad asociada (34, 35). La colistina se ha usado frecuentemente en ganadería para el control de infecciones gastrointestinales causadas por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli* y *Salmonella,* así como de otras enterobacterias que pueden afectar a los animales que integran la producción ganadera (36-38). Además, este antimicrobiano se ha utilizado durante años como promotor del crecimiento, sobre todo en países asiáticos y en Europa hasta el año 2006, cuando se prohibió su uso para tal fin (39). Actualmente, la colistina está autorizada en España, y en Europa en general, para emplearse en animales para tratamiento y metafilaxia (siempre que se haya confirmado previamente la presencia de enfermedad en el rebaño) de infecciones causadas por enterobacterias sensibles a este antimicrobiano (40). Este antimicrobiano suele administrarse como CS, normalmente como premezcla medicamentosa, polvos o soluciones orales en el alimento, en el agua de bebida o a través de dietas de reemplazo de leche (3, 37, 41), cuya dosis recomendada varía según el producto y la especie animal, desde los 75.000 UI/kg, propuesta para aves de corral, hasta los 100.000 UI/kg para otros animales como cabras, conejos y cerdos (42, 43).

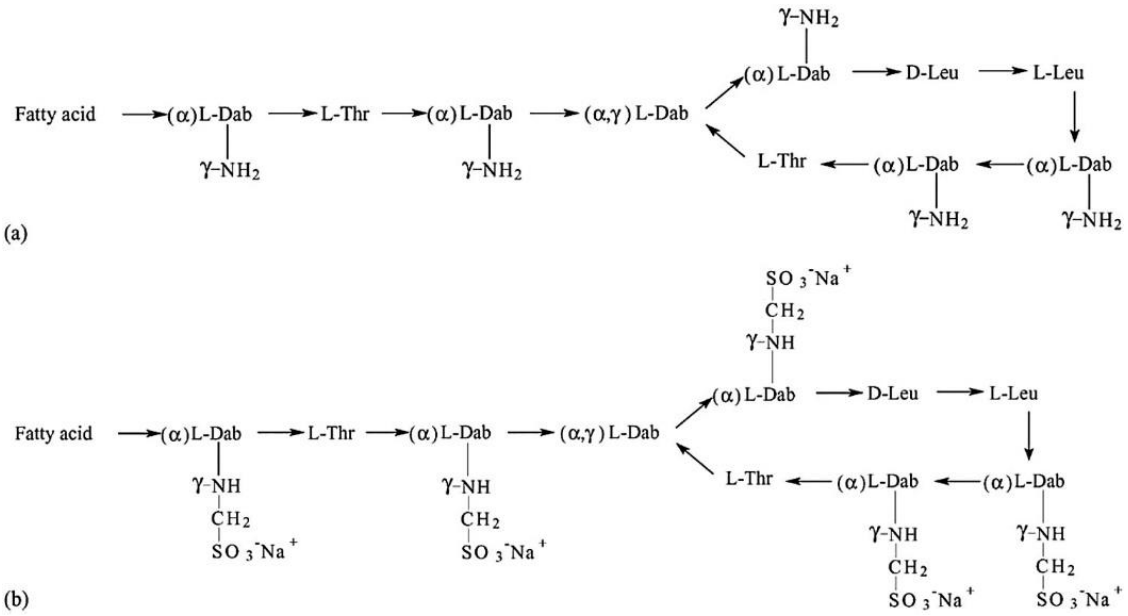
Tanto en medicina humana como veterinaria se encuentran disponibles los dos tipos de formulación de la colistina (CS y CMS) (31, 37, 44). El CS es administrado por vía oral en comprimidos o jarabe, mientras que el CMS se aplica por diferentes vías (intramuscular o parenteral) en forma de pro-fármaco. Aunque ambos pueden ser administrados mediante inhalación, el CS alcanza mayores niveles de broncoconstricción (9, 10, 45). Las formas de excreción de ambos compuestos también varían; aunque ambos se eliminan por vía renal, el CS muestra una elevada tasa de reabsorción renal, por lo que su excreción se lleva a cabo, principalmente, por vía fecal (15, 46, 47).

1.4. Estructura y mecanismo de acción de la colistina

La molécula de colistina está compuesta por un heptapéptido cíclico que forma un anillo hidrofílico y una cola de tres péptidos, unido mediante un enlace α-amida a una cadena de ácido graso, que constituye la parte hidrofóbica (48). Dependiendo del número de aminoácidos y ácidos grasos presentes en la molécula se pueden obtener hasta 30 componentes distintos, siendo las colistinas A y B los compuestos más utilizados (figura 1) con un peso de 1.169 y 1.155 g/mol,

respectivamente, dado que la cadena de ácido graso de la colistina B es una molécula de carbono más corta que la de la colistina A (31, 48-50).

Figura 1. Estructura de colistina A y B.

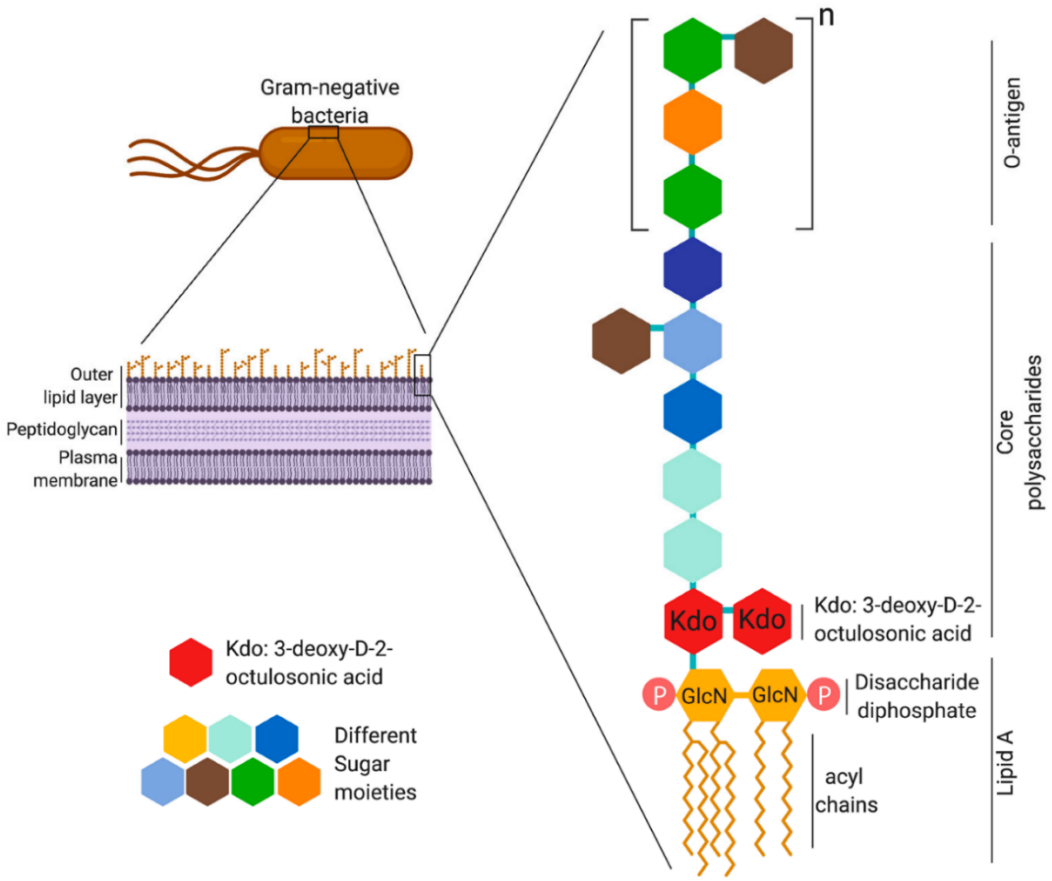


a) Estructuras de las moléculas de colistina A y B; (b) estructuras del metanosulfato de colistina A y B: ácido graso [(fatty acid): ácido 6metil-octanoico para colistina A y ácido 6-metil-heptanoico para colistina B; Thr (threonina); Leu (leucina); Dab (ácido α, γ-diaminobutirico)]. "α" y "γ" indican los grupos "amino" respectivos involucrados en el enlace peptídico. Li *et al*. (2005) (18). Figura incluida con el permiso de Elsevier and *Copyright Clearance Center*.

La colistina tiene efecto bactericida y su principal diana de acción es el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, aunque el mecanismo de acción no se conoce con exactitud (10, 37, 50). El LPS es una estructura característica de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que, a diferencia de la mayoría de las membranas celulares, no está compuesta por una bicapa de fosfolípidos, sino de una estructura asimétrica compuesta básicamente por fosfolípidos en la parte interna y moléculas de LPS en la cara externa. Esta estructura juega un importante papel en la permeabilidad de la pared celular y en la relación con el hospedador, actuando, además, como una endotoxina debido a la fuerte respuesta que despierta en el sistema inmunitario del mismo (26, 29, 37, 51, 52). El LPS está compuesto, fundamentalmente, de tres estructuras: lípido A, un cuerpo de oligosacáridos no repetitivos y el antígeno O (figura 2). El lípido A constituye la parte

hidrofóbica de esta estructura, que se encuentra anclada a la membrana externa por un extremo y, por el otro, al cuerpo de oligosacáridos mediante residuos de ácido 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosónico (Kdo) y L-glycero-D-manno-heptopyranose (Hep). El cuerpo de oligosacáridos se divide en dos partes, cuerpo interno y externo, de los cuales el cuerpo interno (parte que se une al lípido A) se encuentra altamente conservado en todas las bacterias Gram negativas, mientras que la parte externa presenta una mayor diversidad y se compone fundamentalmente de residuos de glucosa. Finalmente, el antígeno O se une a la parte externa del cuerpo de oligosacáridos y se compone de un polisacárido de longitud variable (de dos a ocho oligosacáridos repetitivos) (53). Aunque el LPS es una estructura muy conservada en bacterias Gram negativas, puede presentar modificaciones dependiendo de la especie bacteriana e incluso de la cepa, muchas de las cuales pueden estar inducidas como respuesta a estímulos ambientales del entorno bacteriano (26, 29, 37, 51, 52).

Figura 2. Estructura del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas.



Estructura del lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, donde "n" puede representar diferente número de repeticiones. Mazgaeen *et al*. (2020). Figura bajo licencia *Creative Commons Attribution* (CCA): https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

De acuerdo con la composición de la pared celular de las bacterias Gram negativas y, en especial, del LPS, el modelo más aceptado sobre el mecanismo de acción de la colistina considera que es una molécula con carga positiva con una elevada afinidad por el LPS bacteriano, al que se une mediante interacción electrostática. Esta unión tiene lugar entre el residuo de ácido diaminobutírico de la colistina (parte catiónica) y los grupos fosfato del lípido A del LPS (parte aniónica), compitiendo por los cationes divalentes de Mg^{2+} y Ca^{2+}, que normalmente actúan estabilizando el LPS, debilitando así la estructura de la membrana bacteriana. Una vez unida a la bacteria, la colistina produce un aumento de la permeabilidad de la pared celular, causando la pérdida de contenido periplásmico y, finalmente, induciendo la muerte de la bacteria (10, 16, 54).

1.5. Resistencia a colistina

La resistencia bacteriana a colistina se basa, principalmente, en la modificación del LPS, que es la diana principal de la colistina, alterando la carga neta negativa de esta estructura e impidiendo la unión de la colistina al LPS. El mecanismo más común y efectivo es mediante la sustitución de cationes de los grupos fosfato mediante la adición de la 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) al lípido A del LPS, con lo que se logra neutralizar la carga negativa (desde -1,5 hasta 0). El segundo mecanismo más común es la producción de una fosfoetanolamin transferasa que añade una fosfoetanolamina (PEtN) al lípido A del LPS o al cuerpo de oligosacáridos unido al Kdo, reduciendo también la carga negativa, aunque en menor medida que el anterior mecanismo (de -1,5 a -1). De esta forma, dado que la colistina es una molécula catiónica, ambos mecanismos reducen su afinidad por el LPS por similitud de cargas, aumentando la resistencia (31, 37, 55).

Diversas bacterias Gram negativas pueden presentar resistencia intrínseca a la colistina normalmente debida a que el lipopolisacárido (LPS) de estas especies se encuentra modificado por el azúcar L-Ara4N, a la pérdida del LPS o a la modificación lipídica de la membrana externa que reduce su permeabilidad e impide el acceso de las moléculas de colistina al LPS, lo que, en todos los casos, reduce la afinidad electrostática del LPS por las moléculas de colistina (11, 31, 55, 56). Algunas de estas especies y/o géneros bacterianos son *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp. y algunas especies de *Aeromonas* spp. y *Burkholderia* spp. (37, 55, 57-59).

Las bacterias Gram negativas también pueden desarrollar resistencia a colistina mediante procesos de deacilación del Lípido A (60) e hidroxilación del Kdo (61).

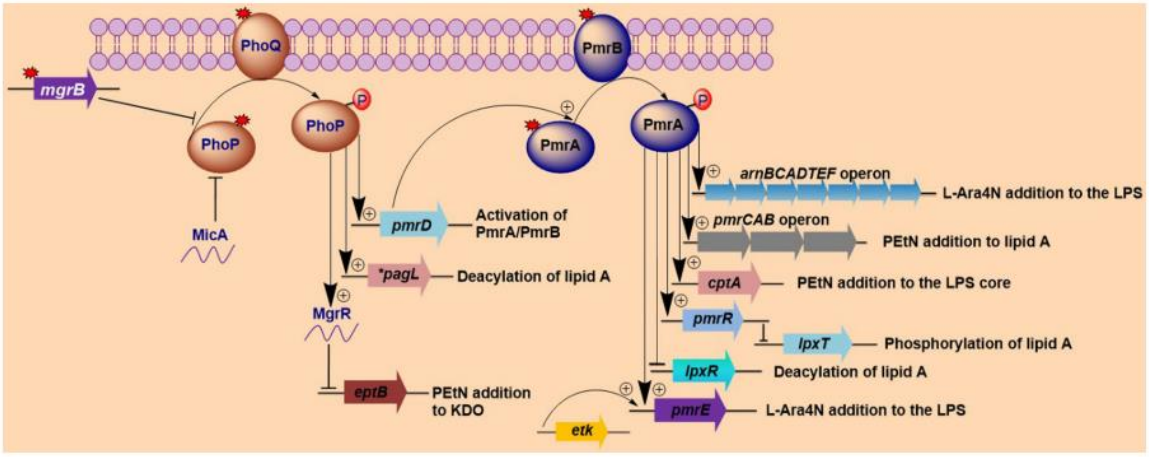
1.5.1. Resistencia adquirida

1.5.1.1. Mutación de genes

La resistencia a colistina puede adquirirse por la aparición de mutaciones puntuales y/o la inserción de transposones en los genes que codifican los sistemas de doble componente PmrA/PmrB (PmrA/B) y PhoP/PhoQ (PhoP/Q), produciendo la activación/inactivación de alguno

de los elementos producidos por las cascadas de reacciones que derivan de su actividad (37, 55). Los sistemas de doble componente PmrA/B y PhoP/Q (figura 3) se encuentran inicialmente reprimidos por genes reguladores como *mgrB*. La inactivación de este gen represor desemboca en la sobreexpresión del sistema *phoPQ*, activando el operón *pmrHFIJKLM* y habilitando la producción de L-Ara4N, uno de los elementos causantes de la resistencia a colistina al anclarse en la estructura del LPS. El sistema PhoP/Q también puede activar otros genes que producen deacilaciones en el lípido A del LPS, como el gen *pagL*, (descrito en *Salmonella* spp) que se traduce también en un aumento de la resistencia a colistina. El sistema PmrA/B (que es regulado positivamente por la proteína codificada por *pmrD*), también pude ser activado por mutaciones en los genes *pmrA* y *pmrB*. Una vez en funcionamiento este sistema induce la activación del operón *arnBCADTEF* y el gen *pmrE*, que permiten la modificación del LPS mediante la unión de L-Ara4N. Además de estos elementos que componen la cascada de reacciones de los sistemas PmrA/B y PhoP/Q, se producen otros productos intermediarios que desembocan, principalmente, en la adición de PEtN o L-Ara4N al LPS que se traduce en una reducción de la sensibilidad frente a colistina (31, 37, 55) (figura 3).

Figura 3. Elementos involucrados en la modificación del LPS en bacterias Gram negativas.

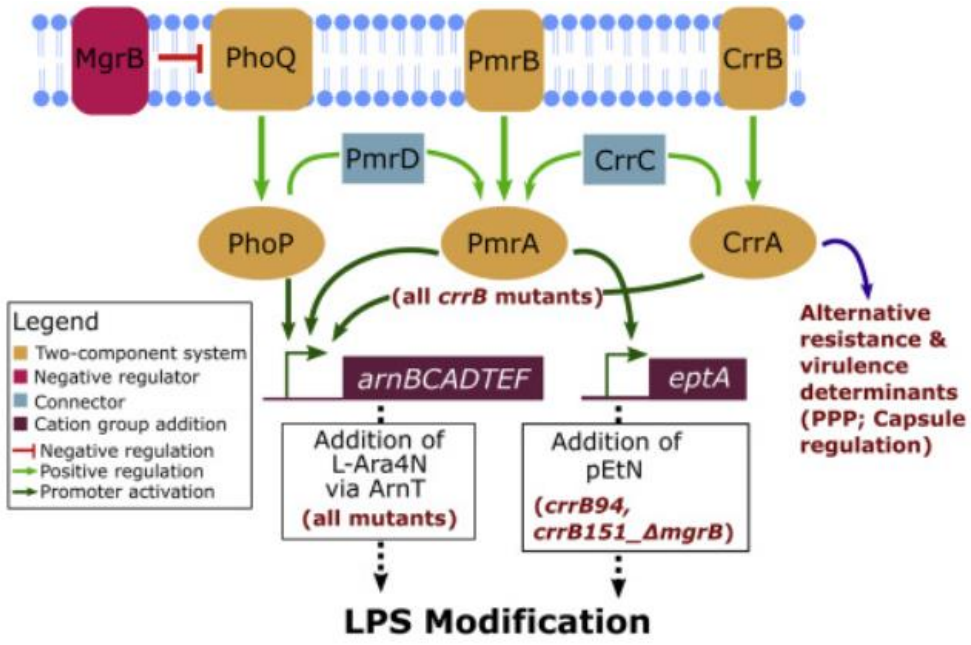


Olaitan *et al*. (2014) (55). Figura bajo licencia *Creative Commons Attribution* (CCA): https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Un tercer sistema de doble componente, CrrA/CrrB (CrrA/B) parece influir también en la resistencia a colistina (figura 4). CrrB es una histidin quinasa, transductora de señales, por lo que

la aparición de mutaciones en el gen *crrB* altera la actividad kinasa, pudiendo aumentar la autofosforilación del sistema CrrA/B. La fosforilación de CrrA activaría CrrC, elemento regulador que a su vez activaría la sobreexpresión del sistema PmrA/B, desembocando en la modificación del LPS y, por tanto, reduciendo la sensibilidad de la bacteria frente a la acción de la colistina (62, 63).

Figura 4. Acción del sistema de doble componente *crrA/B* sobre el resto de los elementos modificadores del LPS de bacterias Gram negativas.



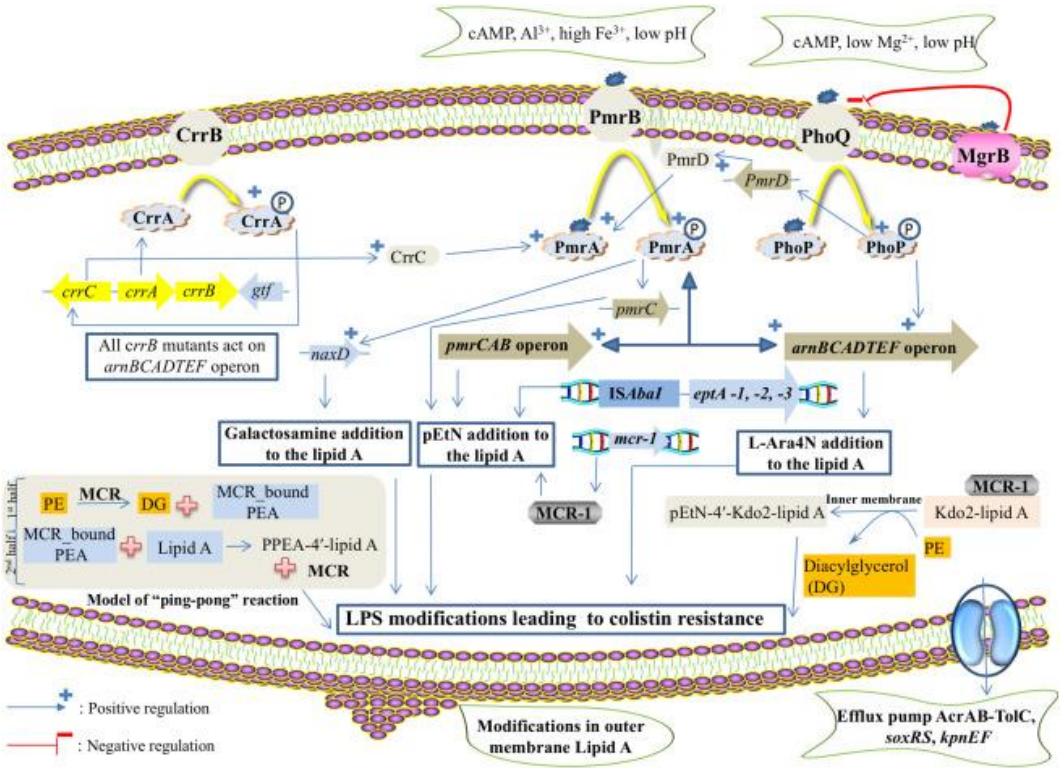
McConville *et al*. (2020) (63). Figura bajo licencia *Creative Commons Attribution* (CCA) https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

1.5.1.2. Resistencia mediada por adquisición de genes de resistencia de la familia *mcr*

La resistencia a colistina también se puede asociar a la presencia de genes de la familia *mcr*. Los genes *mcr* codifican una fosfoetanolamin transferasa que induce cambios en el LPS bacteriano mediante la adición de PEtN al Kdo del LPS, reduciendo la carga negativa de esta estructura y confiriendo a la bacteria resistencia a colistina de la misma forma que ocurría con la actividad de los sistemas de doble componente *pmrA/B* y *phoP/Q* (figura 5). Sin embargo, el grado de resistencia que confieren los genes *mcr* a las bacterias portadoras suele ser bajo, mostrando

valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) que oscilan entre 4 y 8 mg/L, comparado con la resistencia que confieren los mecanismos mutacionales anteriormente mencionados, los cuales pueden elevar la CMI hasta 256 mg/L (31, 37, 64-66).

Figura 5. Principales elementos modificadores del LPS en bacterias Gram negativas, incluyendo tanto componentes cromosómicos como plasmídicos.



Zhang *et al.* (2021) (64). Figura incluida con el permiso de Elsevier and *Copyright Clearance Center*.

Estos genes se encuentran principalmente localizados en plásmidos, lo que les otorga una mayor capacidad de diseminación, dado que pueden transferirse entre bacterias por medio de mecanismos de transferencia horizontal. Actualmente hay descritos hasta 10 genotipos diferentes dentro de la familia *mcr*, con diferentes variantes de cada uno de ellos, siendo el gen *mcr-1* el más frecuente en todo el mundo (67-69).

La primera descripción de un gen de la familia *mcr* se realizó en el año 2015 en un plásmido de tipo IncI2 de un aislado de *E. coli* procedente de una muestra de cerdo de China (70). La constatación de la existencia y posible transmisión plasmídica de genes de resistencia a colistina

supuso un cambio de escala en la consideración de la gravedad de la resistencia a este antimicrobiano (70).

Mediante estudios filogenéticos empleando genes codificantes de fosfoetanolamin transferasas (EptA) de otras especies bacterianas, Liu *et al.* (2016) observaron un 63% de homología entre la secuencia de aminoácidos de MCR-1, producto del gen *mcr-1*, y EptA encontradas en *Paenibacillus sophorae*, perteneciente al mismo género que *Paenibacillus polymixa*, bacteria a partir de la cual se obtuvo la molécula de colistina. También se observaron homologías del 63% y del 59% con la EptA de *Enhydrobacter aerosaccus* y *Moraxella catarrhalis*, respectivamente. De esta forma, el estudio filogenético de estos genes apuntó a una potencial transmisión de genes de EptA desde el cromosoma de una bacteria desconocida productora de polimixinas a bacterias de otro género como *E. coli* (70).

Un año después de la descripción del gen *mcr-1*, se describió un segundo genotipo, el gen *mcr-2*, en tres aislados de *E. coli* procedentes de ganado bovino y porcino (71). La estructura aminoacídica de la proteína codificada por este gen conservaba una homología superior al 80% respecto a MCR-1, y alrededor de un 65% con la EptA de *E. aerosaccus* (65%), *P. sophorae* (65%) y *M. osloensis* (64%). Xavier *et al.* (2016) y Gao *et al*. (2016) llevaron a cabo estudios filogenéticos empleando la secuencia completa de las proteínas MCR-1 y MCR-2, e incluyendo la EptA de múltiples especies bacterianas, sugiriendo que los genes *mcr* podrían tener su origen en bacterias del género *Moraxella* (71, 72). Sin embargo, el gen *mcr-2* no era frecuente en Europa, a excepción de Bélgica, donde incluso superaba la frecuencia mostrada por el gen *mcr-1* en aislados de *E. coli* resistentes a colistina procedentes de cerdos (68, 71).

En el año 2017 se describieron cuatro variantes más de genes *mcr* (*mcr-3, -4, -5 y -6*). La variante *mcr-3* fue descrita en un plásmido conjugativo de tipo IncHI2, junto a otros genes de resistencia a antimicrobianos, en un aislado de *E. coli* obtenido de una muestra de cerdo, mostrando la proteína codificada una menor homología en su secuencia de aminoácidos con respecto a MCR-1 y MCR-2, situándose por debajo del 35% (73). El gen *mcr-4* fue descrito en 11 aislados de *E. coli* y uno de *S. enterica* obtenidos a partir de muestras de cerdos procedentes de Bélgica, España e Italia. Este gen se identificó en un plásmido de pequeño tamaño de la familia ColE, que no era conjugativo(74). El gen *mcr-5* fue identificado en un aislado de *S.* Paratyphi y, al igual que el *mcr-4*, se encontraba en un plásmido ColE, sin embargo, analizando su entorno genético, este gen parecía estar asociado a un transposón de la familia *Tn3*, lo que permitía su transferibilidad intracelular entre otras estructuras genómicas (75). A diferencia de los anteriores genes, *mcr-4* y

mcr-5 parecían tener un origen diferente, ya que mediante análisis filogenéticos se observó una mayor homología de MCR-4 y MCR-5 con la EptA de la especie *Shewanella frigidimarina* (74, 75). El gen *mcr-6* fue detectado en el cromosoma de un aislado de *Moraxella pluranimalium* obtenido en Reino Unido, mostrando la proteína MCR-6 un elevado porcentaje de homología con respecto a la secuencia de animoácidos de la proteína MCR-2 (87,9%), reforzando así la hipótesis de que el origen del gen *mcr-2* se encuentra en especies del género *Moraxella*. Hasta la fecha, esta es la única descripción realizada del gen *mcr-6* (76).

En 2018 fueron identificadas dos nuevas variantes de *mcr* (*mcr-7* y *mcr-8*). El gen *mcr-7* se describió por primera vez en un plásmido conjugativo de tipo IncI2 en un aislado de *K. pneumoniae*. Los análisis filogenéticos mostraron una elevada homología de MCR-7 con la EptA de *Aeromonas*, *Citrobacter* y *K. pneumoniae*, con unos porcentajes de homología de 69%-81%, 70% y 70%, respectivamente (77). El gen *mcr-8* fue detectado en un plásmido de tipo IncFII de un aislado de *K. pneumoniae* procedente de una muestra de heces de cerdos. Este gen mostraba mayor homología en la secuencia de bases con el gen *mcr-3*, en comparación con el resto de los integrantes de la familia *mcr* (50,23%) y parecía estar asociado, sobre todo, a *K. pneumoniae*, bacteria que estaría actuando como principal diseminador del gen, tanto en animales como en personas (78).

Por último, los genes *mcr-9* y *mcr-10* son los más recientemente descritos pero, a diferencia del resto de variantes, ambos fueron detectados *in silico*. El gen *mcr-9* fue identificado en 2019 analizando la secuencia nucleotídica de un aislado de *S.* Typhimurium, procedente de una muestra clínica humana, y estaba localizado en un plásmido de tipo IncHI2 (79). El gen *mcr-10*, descrito en 2020, también se detectó en un aislado procedente de una muestra humana, pero en este caso en la especie *Enterobacter roggenkampii*, en la cual se encontraba en un plásmido de tipo IncFIA. El gen *mcr-9* mostraba una homología en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada del 64,5% comparado con el producto del gen *mcr-3.17*, mientras que MCR-10 conservaba una homología del 82,9% con MCR-9. Ambos aislados portadores de *mcr-9* y *mcr-10* no presentaban resistencia fenotípica frente a colistina, ya que la CMI que se observó no superaba los 2 mg/L, siendo su identificación por homología con otros genes *mcr* previamente descritos. Además, se llevaron a cabo ensayos de conjugación con ambos genes para observar su transferibilidad y su capacidad de conferir resistencia; sin embargo, aunque en ambos casos se consiguió transferir el gen, la reducción de sensibilidad frente a colistina que mostraban las bacterias receptoras no era suficiente como para considerar a los aislados portadores como clínicamente resistentes al

antimicrobiano, ya que su CMI se mantenía en valores inferiores a 2 mg/L, punto de corte establecido por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para la determinación fenotípica de resistencia a colistina en enterobacterias (79, 80).

Asimismo, comparando los genes de la familia *mcr* entre sí, se observan diferentes grados de homología que separan la familia *mcr* en tres subgrupos (figura 6). Uno de estos subgrupos está compuesto por *mcr-1*, *mcr-2* y *mcr-6*, otro lo forman *mcr-3, mcr-4, mcr-7, mcr-8, mcr-9 y mcr-10* y el tercer grupo solo está integrado por *mcr-5*, el cual parece ser la variante más diferente de la familia y cuyos porcentajes de homología con respecto al resto de genes no supera en ningún caso el 36,5% (37, 68, 80). Así, teniendo en cuenta los diferentes grados de homología observados en la familia *mcr*, cada grupo podría tener un origen diferente, tal como apuntan diferentes estudios, pudiendo proceder los genes *mcr-1, -2* y *-6* del género *Moraxella* spp., y los genes *mcr-3, -4, -7, -8, -9* y -10 del género *Aeromonas* spp., mientras que el origen del *mcr-5* aún se desconoce (68, 70, 71, 73-80).

Figura 6. Porcentajes de homología entre las diferentes variantes de la familia MCR.

	MCR-1	MCR-2	MCR-3	MCR-4	MCR-5	MCR-6	MCR-7	MCR-8	MCR-9	MCR-10
MCR-1		81,3%	34,2%	32,7%	35,5%	82,8%	34,1%	32,5%	35,8%	29,3%
MCR-2	81,3%		34,2%	33,8%	34,6%	87,9%	33,9%	32,0%	32,8%	27,1%
MCR-3	34,2%	34,2%		45,7%	34,4%	32,4%	69,8%	41,3%	64,6%	61.6%
MCR-4	32,7%	33,8%	45,7%		33,4%	32,5%	44,6%	39,7%	42,9%	42,5%
MCR-5	35,5%	34,6%	34,4%	33,4%		35,2%	36,1%	35,4%	32,7%	28,9%
MCR-6	82,8%	87,9%	32,4%	32,5%	35,2%		32,4%	32,4%	32,8%	26,5%
MCR-7	34,1%	33,9%	69,8%	44,6%	36,1%	32,4%		39,0%	61,6%	58,3%
MCR-8	32,5%	32,0%	41,3%	39,7%	35,4%	32,4%	39,0%		42,6%	35,8%
MCR-9	35,8%	32,8%	64,6%	42,9%	32,7%	32,8%	61,6%	42,6%		82,9%
MCR-10	29,3%	27,1%	61.6%	42,5%	28,9%	26,5%	58,3%	35,8%	82,9%	

90,0% - 100%
80,0% - 90,9%
70,0% - 79,9%
60,0% - 69,9%
50,0% - 59,9%
40,0% - 49,9%
30,0% - 39,9%
20,0% - 29,9%

Porcentajes de homología de la secuencia de aminoácidos de cada uno de los productos de los genes de resistencia a colistina que componen la familia *mcr.* Los datos que se incluyen en la tabla se han obtenido de Ling *et al.* (2020) (68) y Wang *et al*. (2020) (80).

1.6. Distribución de los genes de la familia *mcr*

Dado que el gen *mcr-1* era identificado con mayor frecuencia en enterobacterias procedentes de muestras de animales y alimentos que de personas, Liu *et al.* (2016) sugirieron que la familia *Enterobacteriaceae* podría estar actuando como reservorio, manteniendo estable el gen *mcr-1,* incluso en ausencia de presión selectiva (70). A partir de 2015, empezó el cribado de colecciones de bacterias y, en cuestión de un año, el gen *mcr-1* había sido descrito en diferentes países de los cinco continentes habitados (67), siendo detectado en España por primera vez en 2016 en cinco aislados de *E. coli* y cuatro de *S. enterica* procedentes de muestras de pavos y cerdos procesadas en el Centro VISAVET. Este hallazgo sentó las bases del desarrollo de la presente tesis doctoral (81).

Los genes *mcr-1* y *mcr-9* se encuentran globalmente distribuidos, siendo identificados en países de todos los continentes (67, 68, 70, 82). Aunque en menor medida, *mcr-3* y *mcr-5* se encuentran también ampliamente distribuidos por todo el mundo (68, 83, 84), mientras que el resto de las variantes muestran una distribución geográfica más limitada, como es el caso de *mcr-2*, *mcr-4* y *mcr-8*, los cuales han sido identificados solamente en un número reducido de países (68, 71, 74, 78, 85, 86). Finalmente, los genes *mcr-6*, *mcr-7* y *mcr-10* son los menos frecuentes: *mcr-6* solo se ha descrito en Reino Unido (76), *mcr-7* cuenta con casos aislados en Alemania y China (77, 87) y *mcr-10* parece limitarse al este de Asia (80, 84, 88-91), a pesar de que también se ha documentado su presencia de forma ocasional en Suiza y Egipto (92, 93).

1.7. Entorno genético de los genes *mcr*

En el entorno genético de los genes *mcr* se encuentran otros elementos que acompañan, con frecuencia, a estos genes. En estos casos, los genes normalmente se encuentran flanqueados por secuencias de inserción, probablemente responsables de su integración en diferentes estructuras genómicas como plásmidos o el cromosoma bacteriano (94). El gen *mcr-1* se ha asociado en multitud de estudios a la secuencia de inserción IS*Apl1*, conformando la secuencia IS*Apl1* – *mcr-1* – *pap2* – IS*Apl1*, considerándose como el principal elemento movilizador de esta variante de *mcr* (64, 95, 96). Además, también se ha descrito la presencia del transposón Tn*3* asociado a *mcr-5* y

al gen de resistencia a macrólidos *chrB*, en un claro ejemplo de co-selección de genes mediado por un elemento móvil (75, 97-99), y la del transposón TnAs2 asociado a *mcr-3* (73, 100).

1.8. Estrategias de control de la resistencia a colistina

Las estrategias orientadas al control y vigilancia de la emergencia de resistencias a antimicrobianos se desarrollan dentro del concepto conocido en la comunidad científica como "Una Salud" (*One Health*), un movimiento basado en la agrupación y coordinación de distintas profesiones sanitarias, destacando la medicina humana y veterinaria y las disciplinas dedicadas a la preservación del medio ambiente, para hacer frente a enfermedades de carácter zoonósico, dentro de las que destacan las producidas por bacterias resistentes (101, 102). En el caso de la resistencia a colistina y, en general, la resistencia a antimicrobianos, la medicina humana y veterinaria, así como el entorno, tienen una estrecha relación, pues las bacterias resistentes pueden pasar de animales a personas y viceversa por contacto directo o a través de la cadena alimentaria (5, 103).

La colistina se ha empleado en medicina veterinaria desde la década de los cincuenta en diferentes especies de animales para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas (20, 30), así como en humanos a partir de 1959 (15, 18, 104). En la década de los sesenta se limitó el uso de colistina en personas debido a su toxicidad; sin embargo, siguió empleándose en medicina veterinaria, situación que pudo haber contribuido al establecimiento de un reservorio de genes de resistencia a este antimicrobiano en enterobacterias comensales de animales de abasto (5, 33, 105). Este uso se mantuvo incluso cuando la colistina fue reintroducida en medicina humana como antimicrobiano de último recurso, por lo que la potencial transmisión de bacterias resistentes a colistina desde los animales hacia las personas estaría poniendo en riesgo la utilidad de este antimicrobiano. La transmisión de bacterias desde animales a personas y viceversa puede darse mediante el contacto continuo, conviviendo con ellos como en el caso de las mascotas, o mediante el consumo de alimentos procedentes de animales colonizados por bacterias resistentes (5, 43, 106-108). Asimismo, esta vía adquiere una dimensión mayor gracias al comercio de estos animales y/o alimentos entre diferentes países. Así, cualquier nuevo determinante de resistencia que aparezca en cualquier región del planeta puede ser fácilmente dispersado en poco tiempo (5). Además, estas bacterias resistentes pueden llegar al medioambiente mediante las aguas

residuales, las cuales se convierten en elemento de transmisión de estos microorganismos, que pueden llegar tanto a animales como a personas que entren en contacto con agua contaminada (109-111). Por tanto, resulta de extrema necesidad el establecimiento de estrategias coordinadas para la vigilancia de resistencias a antimicrobianos, como los impulsados por el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) mediante el establecimiento de redes de colaboración como la *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) o la *Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance Network* (CAESAR) (112), combinadas con planes de reducción y uso responsable de los mismos, como los impulsados, tanto por la EMA en el ámbito europeo con el *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (proyecto ESVAC) (41, 113), como por la AEMPS a nivel nacional a través del Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN) (114) para tratar de frenar el progreso de esta amenaza y conservar la utilidad de las terapias actuales el máximo tiempo posible.

1.8.1. Estrategias europeas de control de la resistencia a colistina

El uso de colistina en animales estaba muy extendido en Europa desde antes del año 2000 y los niveles de resistencia eran bajos, situándose en 2013 por debajo del 1% en aislados de *E. coli* procedentes de animales sanos y en torno al 10% en los procedentes de animales enfermos (36). La resistencia a colistina parecía asociarse sólo a la aparición de mutaciones en el cromosoma bacteriano, sugiriendo que la dispersión se llevaba a cabo únicamente de forma clonal, por lo que no suponía una preocupación para las autoridades sanitarias y no se incluía en los programas de vigilancia de resistencias a antimicrobianos (115-117). Sin embargo, la descripción en 2015 del gen *mcr-1* cambió la perspectiva respecto a la resistencia a colistina, que pasó a ser una amenaza para la Salud Pública en todo el mundo. Así, teniendo en cuenta el uso que se había hecho del antimicrobiano en el sector veterinario durante años, y que el gen *mcr-1* tenía un elevado potencial de dispersión al estar localizado en un plásmido (3).

Dada la preocupante situación generada por el auge de las resistencias a antimicrobianos y, en especial, la resistencia a colistina, la Agencia Europea del Medicamento (EMA), a propuesta del Comité para el Uso Veterinario de Productos Medicinales (CVMP), lanzaron en el año 2016 unas recomendaciones para limitar el uso de polimixinas en animales. Estas medidas estaban orientadas a preservar la única vía de tratamiento para infecciones causadas por bacterias

multirresistentes, sumándose a las recomendaciones ya propuestas en el año 2013 sobre el uso responsable de la colistina. Dichas propuestas ya limitaban, en el año 2013, el uso de la colistina al tratamiento de infecciones en animales, evitando, en todo caso, el empleo de antimicrobianos como metafilaxis (118). La principal medida propuesta en el año 2016 por la EMA (41) consistió en reducir el uso de las polimixinas en el sector veterinario de cada país miembro a 5 mg/PCU (biomasa bajo exposición al antimicrobiano expresada en unidades de corrección de población) y preferiblemente por debajo de 1 mg/PCU, en aquellos países que ya mostrasen un consumo moderado de estos productos. No obstante, esta medida no debía suponer un aumento en el consumo de otros antimicrobianos como fluoroquinolonas o cefalosporinas de tercera o cuarta generación, debiéndose alcanzar estos objetivos en un plazo máximo de 3 a 4 años (3), es decir, en los años 2018 - 2019.

Otras recomendaciones que propuso el grupo de expertos de AMEG (*Antimicrobial Advice ad hoc Expert Group*), respaldadas por el CVMP, con el fin de reducir el consumo de colistina en animales, fue la de incluir este antimicrobiano dentro de la categoría 2 de la clasificación AMEG, que incluye los antimicrobianos definidos por la OMS como "antimicrobianos de importancia crítica" (119), así como mejorar el sistema de selección de dosis mediante análisis pK/pD (farmacocinética/farmacodinámica), minimizando al máximo los días de exposición al antibiótico necesarios (120), o mejorar la gestión y bioseguridad de las granjas, mediante estrategias de desinfección y limpieza (121).

1.8.2. Estrategias nacionales de control de la resistencia a colistina

Según los datos aportados por la ESVAC, España ha sido, junto a otros países como Italia, Portugal o Alemania, uno de los países con mayor número de ventas de antimicrobianos para uso veterinario. En el año 2013, las polimixinas fueron el quinto grupo de antimicrobianos más vendido en los 26 países que componían entonces la UE (6,1%), por detrás de tetraciclinas (36,7%), penicilinas (24,5%), sulfonamidas (9,6%) y macrólidos (7,4%), representando la colistina el 99,9% de las ventas de este grupo (3, 41). España ha sido el país con mayores ventas de polimixinas entre los Estados Miembros, alcanzando valores de hasta 36,1 mg/PCU (*Population Correction Unit* (41)) en 2014, por encima de Italia, segundo país con mayor número de ventas de polimixinas con 29,4 mg/PCU (41, 122). Además, España seguía presentando en 2015 el mayor número de ventas de

polimixinas para uso veterinario en la UE (34,9 mg/PCU), detrás se situaba Italia (26,13 mg/PCU) y Portugal (14,45 mg/PCU), mientras que 22 de los 30 Estados Miembros mantenían sus ventas por debajo del límite de 5 mg/PCU, que fue el propuesto por la EMA en 2016 (41, 114).

El Ministerio de Sanidad, por medio de la AEMPS, recogió las ideas y objetivos propuestos por la EMA y, a través del Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (PRAN 2014-2018) (123), se diseñaron diferentes programas sectoriales de participación voluntaria para reducir el consumo de antimicrobianos en diferentes especies animales. En concreto, el plan "Reduce Colistina" pretendía reducir el consumo de colistina en cerdos en un plazo de tres años para bajar en 2019 hasta 5 mg/PCU, sin aumentar el consumo de otros antimicrobianos alternativos como apramicina y neomicina (114). Esta estrategia fue secundada por más del 90% de las empresas del sector porcino en España traduciéndose en una reducción del 98,8% del consumo de polimixinas (114, 124). En general, se logró reducir el consumo de polimixinas en animales destinados a la producción de alimentos de 22 mg/PCU en 2016 hasta 3,3 mg/PCU en 2018, cumpliendo de esta forma en el plazo fijado con los objetivos inicialmente propuestos, reducción que continuó produciéndose anualmente hasta alcanzar 0,39 mg/PCU en 2021 (113, 124).

Por otro lado, el MAPA diseñó un plan de vigilancia del uso de colistina cuyo objetivo fue comprobar que las prescripciones veterinarias cumplan las condiciones de autorización establecidas mediante la Decisión de ejecución de la Comisión de 16.3.2015, en el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE, y establecidas por la AEMPS en las condiciones de autorización de los medicamentos veterinarios en formas de administración oral y contenido en colistina (125).

2. OBJETIVOS

La resistencia a colistina comenzó a considerarse un gran problema de Salud Pública a partir de la primera descripción del gen *mcr-1* debido a que su localización plasmídica incrementaba la capacidad de poder transmitirse entre diferentes poblaciones bacterianas de forma horizontal.

Por otro lado, el uso de colistina en el ámbito veterinario para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas en animales de granja, como pollos o cerdos, podría haber fomentado la selección de cepas bacterianas, fundamentalmente enterobacterias, con susceptibilidad reducida a este antimicrobiano. Estas se estarían transmitiendo hasta las personas a través de la cadena alimentaria, lo que comprometería el uso de polimixinas como antimicrobiano de último recurso en medicina humana. Así, el aumento de bacterias resistentes a colistina suponía una reducción de las alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes, por los que autoridades sanitarias como la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), siguiendo las recomendaciones de la EMA, han impulsado programas para reducir el uso de polimixinas en animales con el fin de preservar la utilidad de los antimicrobianos de última línea.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en esta tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

- Creación y caracterización de un cepario amplio y diverso de enterobacterias resistentes a colistina procedentes de animales.

- Determinación de la presencia, localización genómica (cromosoma o plásmido) y entorno genético de genes de resistencia a colistina.

- Evaluación del efecto que la congelación de muestras biológicas ejerce sobre la población de enterobacterias y las técnicas para su estudio (cultivo bacteriano y detección molecular por qPCR).

- Estudio de la evolución del gen de resistencia a colistina *mcr-1* en cerdos sanos en muestras intestinales obtenidas en diferentes años.

- Evaluación *in vivo* del efecto de la administración de colistina en la diseminación de cepas portadoras del gen *mcr-1*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Cepario RESCOL: bacterias resistentes a colistina de la colección VISAVET-UCM

Se llevó a cabo una revisión de las bases de datos disponibles en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET-UCM) para localizar aislados bacterianos fenotípicamente resistentes a colistina. Dichos aislados fueron obtenidos mediante diferentes protocolos a partir de los muestreos llevados a cabo hasta el año 2016 en animales, alimentos de origen animal y efluentes urbanos de una planta de tratamiento de aguas residuales. Todos ellos se integraron en el cepario denominado RESCOL.

Los aislados de muestras de origen animal procedían de los muestreos realizados por el centro VISAVET-UCM como parte de la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antimicrobianos (VAV), dentro del Programa de Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos en animales destinados al consumo humano del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), llevándose a cabo en cerdos de capa blanca, aves (pavos y pollos) y en bovinos menores de un año. Todas las muestras se conservaron a -40 ^{o}C formando parte de la colección de muestras biológicas del centro VISAVET-UCM.

Los aislados resistentes a colistina de muestras de alimentos de origen animal (huevos de gallina y carnes de diferentes especies) fueron obtenidos dentro del Programa de Vigilancia Sanitaria de la presencia de agentes zoonósicos en alimentos de origen animal realizado anualmente por el Centro VISAVET-UCM para la Comunidad de Madrid. Estas muestras fueron tomadas en establecimientos de comercio minorista como grandes superficies, supermercados y pequeños comercios de la Comunidad de Madrid para evaluar la presencia de los agentes patógenos más comunes capaces de ocasionar toxiinfecciones o intoxicaciones alimentarias.

Además, en esta colección se incluyeron aislados procedentes de muestras de agua de efluentes urbanos recogidas en una planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en la Comunidad de Madrid.

El criterio de inclusión de los aislados en el cepario fue su resistencia fenotípica a colistina siguiendo los criterios del EUCAST, que indican que una bacteria es considerada resistente a colistina si muestra una CMI superior a 2 mg/L en el caso de la familia *Enterobacteriaceae* (126).

Inicialmente, el cepario RESCOL se componía de 163 aislados de 5 especies bacterianas diferentes, obtenidos entre los años 2006 y 2016 (tabla 1). Estos aislados se habían obtenido mediante el uso de protocolos diferentes (no descritos en esta tesis) y habían sido previamente caracterizados. Con el fin de completar esta colección de aislados resistentes a colistina preexistente al comienzo de la presente tesis doctoral, se procesaron las muestras de contenido cecal de ganado porcino pertenecientes a la Red VAV de 2017. En cuanto al origen de los aislados, el 27,6% (45/163) de hisopos intestinales de lechón, el 26,4% (43/169) de heces de pavo, el 23,3% (38/163) procedían de muestras de heces de porcino, mientras que el resto de muestras de origen animal, así como las de alimentos y de efluentes urbanos, mostraron porcentajes inferiores al 6%.

Tabla 1. Distribución por año de aislamiento y tipo de muestra de los 163 aislados bacterianos del cepario RESCOL.

Muestras de animales				
Año	**Especie animal**	**Tipo de muestra**	**Nº de aislados**	**Género/Especie**
2009	Porcino	Heces	1	*S.* Typhimurium variante monofásica
2010	Porcino	Ganglios	1	*S.* Rissen
2010	Porcino	Ganglios	1	*S.* Typhimurium
2011	Porcino	Heces	1	*E. coli*
2011	Porcino	Ganglios	1	*S.* Typhimurium
2011	Porcino	Ganglios	1	*S.* Typhimurium variante monofásica
2013	Porcino	Heces	1	*E. coli*
2014	Pavo	Heces	36	*E. coli*
2015	Bovino	Heces	6	*E. coli*
2015	Porcino	Heces	35	*E. coli*
2015	Bovino	Heces	1	*S.* Rissen
2016	Lechón	Hisopo rectal	42	*E. coli*
2016	Lechón	Hisopo rectal	1	*Enterobacter asburiae*
2016	Lechón	Hisopo rectal	1	*Enterobacter kobei*
2016	Lechón	Hisopo rectal	1	*Klebsiella pneumoniae*
2016	Pavo	Heces	7	*E. coli*
Total (aislados)			**137**	

Muestras de alimentos de origen animal				
Año	**Especie animal**	**Tipo de muestra**	**Nº de aislados**	**Género/Especie**
2013	Ave	Cáscara de huevo	3	*S.* Enteritidis
2014	Porcino	Carne	1	*S.* Typhimurium variante monofásica
2014	Ave	Cáscara de huevo	9	*S.* Enteritidis
2014	Ave	Carne	1	*S.* Typhimurium variante monofásica
2014	Ave	Carne	1	*S.* Enteritidis
2015	Ave	Cáscara de huevo	1	*S.* Enteritidis
2015	Ave	Carne	1	*S.* Enteritidis
2016	Ave	Cáscara de huevo	3	*S.* Enteritidis
	Total (aislados)		**20**	

Muestras de efluentes urbanos				
Año	**Origen de muestra**	**Tipo de muestra**	**Nº de aislados**	**Género/Especie**
2006	Planta de tratamiento de aguas residuales	Agua	1	*S.* Enteritidis
2007	Planta de tratamiento de aguas residuales	Agua	1	*S.* Enteritidis
2008	Planta de tratamiento de aguas residuales	Agua	1	*Salmonella* spp.
2008	Planta de tratamiento de aguas residuales	Agua	1	*Salmonella* spp.
2011	Planta de tratamiento de aguas residuales	Agua	1	*S.* Enteritidis
2012	Planta de tratamiento de aguas residuales	Agua	1	*S.* Enteritidis
	Total (aislados)		**6**	

3.1.2. Cepario COLR: Muestras de ganado porcino

Con el fin de ampliar los aislados resistentes a colistina para el desarrollo de la tesis doctoral, se procesaron 1.140 muestras de contenido cecal de cerdos de capa blanca destinados al consumo humano obtenidas en muestreos realizados en matadero entre los años 1998 y 2021. Los aislados obtenidos a partir del procesado de estas muestras constituyeron el cepario COLR. En la tabla 2 se recoge el número de muestras procesadas de cada año, el estado de la muestra y los análisis realizados.

Tabla 2. Distribución de las muestras analizadas (cerdos de capa blanca procedentes de los muestreos del Programa de Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos en animales sanos).

Año	Nº de muestras procesadas	Estado de la muestra	Análisis realizados[1]
1998	50	Congelada	qPCR
2002	50	Congelada	qPCR
2004	50	Congelada	qPCR
2006	50	Congelada	qPCR
2008	50	Congelada	qPCR
2010	50	Congelada	qPCR + cultivo bacteriano
2012	50	Congelada	qPCR + cultivo bacteriano
2013	50	Congelada	qPCR + cultivo bacteriano
2015	50	Congelada	qPCR + cultivo bacteriano
2017	50	Congelada	qPCR + cultivo bacteriano
2018[2]	272	Fresca	qPCR + cultivo bacteriano
2019	243	Fresca	qPCR + cultivo bacteriano
2021	125	Fresca	qPCR + cultivo bacteriano

[1]Los análisis realizados sobre las muestras consistieron en qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) para la cuantificación del gen de resistencia a colistina *mcr-1* y cultivo bacteriano para la detección de aislados resistentes a este antimicrobiano en caso de haberlos detectado previamente por qPCR; [2]Las muestras de 2018 fueron procesadas en fresco y, de nuevo, tras haber sido congeladas durante un periodo de 6 meses.

Los muestreos desde 1998 hasta 2018 fueron realizados por el centro VISAVET-UCM dentro del Programa de Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos en animales destinados al consumo humano del MAPA. En los años 2019 y 2021 los muestreos fueron realizados por el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, el cual derivó a la unidad de Zoonosis de Transmisión Alimentaria y Resistencia a Antimicrobianos del centro VISAVET-UCM parte de la muestra recogida para el

posterior análisis de la presencia de aislados resistentes a colistina. Los muestreos llevados a cabo en cerdos de capa blanca, dentro del Programa de Vigilancia de Resistencia a Antimicrobianos, se realizaron en los años impares a partir del año 2014, tal como se describe en la decisión de la Comisión Europea 2013/652/EU, basada en la directiva europea 2003/99/EC, por lo que, de forma excepcional, se llevó a cabo por parte del Centro VISAVET-UCM un muestreo adicional en esta especie animal en el año 2018.

Por tanto, se analizaron muestras antiguas (almacenadas a -40ºC) de la colección VISAVET-UCM y nuevas muestras recogidas desde el año 2018. Para el estudio retrospectivo se seleccionaron de forma aleatoria 50 muestras por año a partir de los diez muestreos llevados a cabo desde 1998 hasta 2017. Todas las muestras pertenecientes a los nuevos muestreos (2018, 2019 y 2021) fueron procesadas en fresco durante el desarrollo de la tesis doctoral. Además, las 272 muestras recogidas en el año 2018 fueron analizadas por segunda vez tras haber sido congeladas durante seis meses con el fin de analizar el efecto que ejercía el proceso de congelación, tanto en el crecimiento de bacterias resistentes a colistina en medios de cultivo selectivo, como en la detección de ADN bacteriano por PCR a tiempo real (qPCR).

3.2. Métodos

3.2.1. Métodos de cultivo, aislamiento e identificación

3.2.1.1. Procesado de muestras y aislamiento de bacterias resistentes a colistina

El medio de cultivo empleado para el aislamiento de enterobacterias resistentes a colistina a partir de las muestras de contenido cecal de ganado porcino de 2017 fue el agar MacConkey suplementado con colistina (MCK-COL) a una concentración de 8 mg/L. Para llevar a cabo el aislamiento de estas bacterias, en primer lugar, se diluyeron 25 g de heces en 90 mL de medio de enriquecimiento (agua de peptona), se sembraron 100 µL en medio MCK-COL y se incubaron las placas a 37 ^{o}C durante 24 horas. Según las indicaciones del fabricante, en este medio selectivo para enterobacterias, pueden crecer colonias bacterianas fermentadoras de lactosa (Lact+), de color rosado, y colonias no fermentadoras de lactosa (Lact-), incoloras. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una colonia de cada tipo, Lact+ y Lact-, y se sembró cada una en una placa de agar sangre (AS). Tras la incubación en las mismas condiciones, se volvieron a sembrar en medio MCK-COL tras haber realizado una suspensión 0,5 en la escala McFarland, con el objetivo de descartar falsos positivos. En caso de observar crecimiento, se llevó a cabo la congelación del aislado desde la placa de AS, asignándole un número de referencia con terminación COL1 para aislados Lact+ o COL2 para aislados Lact-.

En el año 2018 comenzó a comercializarse un nuevo medio de cultivo selectivo denominado *ChromID Colistin R Agar* (COLR) (*bioMérieux*, Francia), que ofrecía un elevado porcentaje de especificidad y sensibilidad para el aislamiento de enterobacterias resistentes a colistina (127, 128). A partir de su comercialización, se llevó a cabo un nuevo análisis con este medio de una selección de muestras (50 por año) conservadas en congelación (periodo comprendido entre los años 1998 - 2017) que habían sido procesadas empleando otros protocolos no descritos en esta tesis. También se aplicó este protocolo en el análisis de todas las muestras de contenido cecal de cerdos sanos recogidas en los años 2018, 2019 y 2021, homogeneizando el procesado de las muestras de ambos periodos bajo el mismo protocolo. Todos los aislados obtenidos mediante el uso de este medio de cultivo conformaron el cepario COLR. El protocolo COLR se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. De cada muestra se tomó un gramo de contenido cecal, se diluyó en 2 mL de solución salina fisiológica (SSF) y se tomaron 50 µL para sembrarlos en 9 mL

de BHI (*Brain-Heart Infusion broth*) suplementado con un disco de colistina de 10 µg. Tras una incubación de cuatro horas a 37 ºC, se inocularon 50 µL en una placa COLR mediante siembra por agotamiento y se incubó 24 horas a 37ºC. En este medio se puede observar, fundamentalmente, el crecimiento de bacterias Gram negativas resistentes a colistina, identificándose colonias con tres morfologías diferentes según el color observado: rosas-burdeos, verde-azuladas y blancas/incoloras. Tras la incubación, se tomó un ejemplar de cada morfología por placa y se cultivaron en AS durante 24 horas a 37 ºC, con el fin de obtener cultivos puros de cada uno de estos aislados. Por tanto, en función del crecimiento, se pudieron obtener hasta tres aislados por muestra.

Todos los aislados bacterianos obtenidos se conservaron a -40 ºC, empleando un medio de congelación líquido a base de triptona (2,5%), glicerina (20%) y leche desnatada (5%). Además, cada uno de ellos fue etiquetado de diferente forma según el color que presentaba su crecimiento en COLR para garantizar una correcta trazabilidad. Tras el procesado de cada muestra, se tomaron 3 g de contenido cecal sin diluir para su congelación directa a -40 ºC y a los 1.950 µL restantes de la muestra diluida en SSF, se añadieron 500 µL de glicerol para la conservación de las estructuras celulares en condiciones de congelación a -40 ºC.

3.2.1.2. Identificación de los aislados resistentes a colistina de la colección COLR

La identificación de género y especie bacteriana de cada uno de los aislados de la colección COLR se llevó a cabo mediante espectrometría de masas utilizando el equipo *Bruker Daltonics UltrafleXtrem* MALDI TOF/TOF (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemania) y la aplicación MALDI-TOF *Biotyper*. La identificación de los aislados que no se pudo realizar correctamente por esta técnica (los que obtuvieron puntuaciones inferiores a 1,700), se completó mediante pruebas bioquímicas empleando pruebas multisustrato *API® 20-E Enterobacteriaceae identification kit* (*bioMérieux*, Francia) y/o técnicas de detección molecular, como la secuenciación genómica. En el caso de los aislados presuntivos de *E. coli* (colonias fermentadoras de lactosa, Lact+, en MCK-COL o colonias rosa/burdeos en COLR), la confirmación de especie se realizó mediante PCR convencional específica para la detección del gen *uidA* que codifica la enzima β-D-glucuronidasa de *E. coli* (129, 130). Los cebadores empleados se detallan en la tabla I del anexo I. El protocolo de PCR fue el que describen Cabal *et al.* (2013) (129): un ciclo de 95 ºC durante 15 minutos, 30 ciclos de 94 ºC durante 30 segundos, 55 ºC durante 1 minuto y 72 ºC durante 1 minuto, seguidos de un ciclo final de a 72 ºC durante 10 minutos.

En función de la naturaleza habitual de la resistencia a colistina, se definieron dos grandes grupos de bacterias (Miguela-Villoldo *et al.*, 2020):

- Géneros de bacterias naturalmente sensibles a colistina, grupo que se denominó con las siglas ACRB (*Acquired Colistin Resistance Bacteria*).
- Géneros de bacterias que suelen ser resistentes de forma intrínseca a la acción de la colistina, grupo denominado con las siglas NCRB (*Naturally Colistin Resistant Bacteria*).

El estudio de la resistencia a colistina en enterobacterias se centró en los géneros bacterianos que conforman el grupo ACRB, dado que son aislados naturalmente sensibles a colistina que adquieren resistencia por diferentes mecanismos, lo que permitió analizar la evolución de la resistencia a colistina. Así, una vez identificados los aislados obtenidos por cultivo, la caracterización fenotípica y molecular de la resistencia a antimicrobianos solo se realizó en los aislados que conformaron el grupo ACRB.

3.2.1.3. Caracterización fenotípica: antibiogramas

Los antibiogramas de los aislados del cepario RESCOL y de los ACRB del cepario COLR se realizaron por el método de microdilución en caldo descrito en la norma ISO 20776-1, incluyendo los antimicrobianos descritos en la Decisión de la Comisión Europea 2013/252/EU (tabla 3).

Tabla 3. Antimicrobianos y rango de concentraciones incluidos en los paneles de microdilución EUVSEC y EUVSEC2.

Panel EUVSEC			
Antimicrobiano	**Rango (mg/L)[1]**	**Antimicrobiano**	**Rango (mg/L)[1]**
Ácido nalidíxico (NAL)	4 - 128	Colistina (COL)	1 - 16
Ampicilina (AMP)	1 - 64	Gentamicina (GEN)	0,5 - 32
Azitromicina (AZI)	2- 64	Meropenem (MERO)	0,03 - 16
Cefotaxima (FOT)	0,25 - 4	Sulfametoxazol (SMX)	8 - 1024
Ceftazidima (TAZ)	0,5 - 8	Tetraciclina (TET)	2 - 64
Ciprofloxacino (CIP)	0,015 - 8	Tigeciclina (TGC)	0,25 - 8
Cloranfenicol (CHL)	8 - 128	Trimetoprim (TMP)	0,25 - 32

Panel EUVSEC 2			
Antimicrobiano[1]	**Rango (mg/L)[1]**	**Antimicrobiano[1]**	**Rango (mg/L)[1]**
Cefepime (FEP)	0,06 - 32	Ceftazidima/ácido clavulánico (T/C)	0,12/4 - 64/4
Cefotaxima (FOT2)	0,25 - 64	Ertapenem (ETP)	0,015 - 2
Cefotaxima/ácido clavulánico (F/C)	0,06/4 - 64/4	Imipenem (IMI)	0,12 - 16
Cefoxitina (FOX)	0,5 - 32	Meropenem (MERO2)	0,03 - 16
Ceftazidima (TAZ2)	0,25 - 128	Temocilina (TRM)	0,5 - 128

[1] Rango de concentraciones en los que está distribuido cada antimicrobiano en las placas de microdilución; los puntos de corte empleados para determinar si un aislado es resistente o sensible a cada antimicrobiano incluido en ambos paneles pueden variar en función de la especie bacteriana y se establecieron siguiendo el criterio de EUCAST (126).

En primer lugar, se realizó una suspensión de turbidez 0,5 en la escala McFarland a partir de un cultivo en pureza de cada aislado incluido en el estudio. Se tomaron 50 µL de la suspensión y se añadieron a 9.950 µL de caldo *Mueller-Hinton II* cationes ajustados (*Becton Dickinson*, Le Pont de Claix, Francia), creando una dilución 1:200. Posteriormente, se dispensaron 50 µL de la dilución en cada pocillo de las microplacas *Sensititre® EUVSEC* (*Trek Diagnostic Systems,* Estados Unidos) y se incubaron 24 horas a 37 ^{o}C. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura e interpretación de los resultados de CMI frente a cada uno de los antimicrobianos que componían el panel (tabla 3).

La sensibilidad o resistencia frente a cada antimicrobiano se determinó empleando los puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs) de EUCAST (126). El criterio de inclusión de cada aislado en el cepario fue su resistencia a colistina siguiendo los criterios de EUCAST anteriormente indicados en el apartado 3.1.1. Además, en los casos en los que un aislado presentaba un perfil de resistencia compatible con la producción de betalactamasas de espectro extendido y/o carbapenemasas, se utilizó el panel de antimicrobianos *EUVSEC2* (*Trek Diagnostic Systems*, Estados Unidos), compuesto por los antimicrobianos β-lactámicos descritos en la tabla 3.

3.2.2. Caracterización molecular

3.2.2.1. Detección de genes de resistencia a colistina de la familia *mcr* mediante PCR convencional

En todos los aislados (colecciones RESCOL y COLR), la detección molecular de los genes de resistencia a colistina se llevó a cabo mediante PCR convencional. Se empleó el protocolo descrito por Rebelo *et al*. (2018) (131) para la detección mediante una PCR múltiple de los genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*, que son los genes de la familia *mcr* más frecuentes en todo el mundo (68). Los cebadores utilizados se detallan en la tabla II del anexo I. La extracción de ADN de cada aislado se llevó a cabo mediante ebullición de una suspensión bacteriana en SSF, obtenida a partir de un cultivo en pureza de cada aislado. Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en termocicladores *T100™ Thermal Cycler* (*Bio-Rad Laboratories*) siguiendo el siguiente programa: un ciclo de 94 ºC durante 15 minutos, 25 ciclos de 94 ºC durante 30 segundos, 58 ºC durante 1 minuto y 30 segundos y 72 ºC durante 1 minuto, seguidos de un ciclo final de a 72 ºC durante 10 minutos (Rebelo *et al*., 2018).

3.2.2.2. Detección de genes productores de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas mediante PCR

En todos los aislados con fenotipo compatible con la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) de la colección RESCOL y también en los aislados ACRB del cepario COLR, se utilizó una PCR múltiple para la detección de las principales familias de betalactamasas y/o carbapenemasas presentes en enterobacterias.

Para la detección de genes productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), se incluyeron los genes bla_{SHV}, bla_{TEM} y $bla_{CTX\text{-}M}$, cuyos cebadores se detallan en la tabla II del anexo I. El programa de PCR empleado fue el siguiente: un ciclo de 95 ºC durante 15 minutos, 30 ciclos de 95 ºC durante 30 segundos, 60 ºC durante 1 minuto y 30 segundos y 72 ºC durante 2 minutos, seguidos de un ciclo final de a 72 ºC durante 10 minutos. Una vez identificada la familia de betalactamasas que producían, y con el resultado de la prueba de sensibilidad frente a cefalosporinas y su combinación con inhibidores (apartado 3.2.1.3), se procedió a la confirmación

del genotipo mediante secuenciación genómica y análisis de las secuencias de ADN (apartado 3.2.3.1).

Para la detección de genes codificantes de carbapenemasas, se empleó una PCR múltiple para detectar los genes bla_{KPC}, bla_{VIM} y bla_{NDM} y otra simple para el gen bla_{OXA-48}. Para ello se usaron los cebadores especificados en la tabla II del anexo I, empleando el siguiente protocolo para ambas PCR: un ciclo de 95 ºC durante 15 minutos, 30 ciclos de 95 ºC durante 30 segundos, 56 ºC durante 1 minuto y 72 ºC durante 1 minuto, seguidos de un ciclo final de a 72 ºC durante 10 minutos. Al igual que con las betalactamasas, una vez obtenido el resultado de PCR y de la prueba de sensibilidad a carbapenemes (apartado 3.2.1.3), la determinación de la variante de los genes se llevó a cabo mediante secuenciación genómica y análisis de las secuencias de ADN (apartado 3.2.3.1).

3.2.2.3. Cuantificación del gen *mcr-1* en muestras mediante PCR SYBR Green a tiempo real

Para llevar a cabo la cuantificación del gen *mcr-1* en muestras se tomó como referencia la metodología empleada por Li *et al.* (2017), donde se describe el desarrollo de la técnica de PCR a tiempo real empleando el fluoróforo *SYBR Green* como marcador del ADN amplificado para la detección de los genes de resistencia a colistina *mcr-1*, *mcr-2* y *mcr-3* (132).

El proceso de extracción directa de ADN de las muestras de contenido cecal se realizó utilizando el kit comercial *FASTI001-1 FavorPrep Stool DNA Isolation Mini Kit* (*Favorgen-Europe*, Viena). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se tomaron 200 mg de contenido cecal por muestra o 200 µL en caso de que la matriz fuese líquida (muestras congeladas diluidas) y se llevó a cabo el proceso de extracción por columnas de unión al ADN. Finalmente, el ADN se eluyó en un volumen de 200 µL. Una vez realizada la extracción, se replicó el diseño descrito por Li *et al*. (2017), utilizando la *master mix PowerUp™ SYBR™ Green* (*Thermo Fisher Scientific*, Vilna) y los cebadores para la detección del gen *mcr-1* descritos en la tabla III del anexo I. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termocicladores *CFX96* (*Bio-Rad*) con el siguiente programa: un ciclo de 50 ºC durante 2 minutos, otro ciclo de 95 ºC durante 3 minutos, 40 ciclos de 95 ºC durante 30 segundos, 60 ºC durante 30 segundos y 72 ºC durante 30 segundos, seguidos de una subida gradual de temperatura de 72 ºC a 95 ºC para formar la curva de fusión del ADN y así determinar la

especificidad del ensayo. En todas las muestras analizadas, la temperatura de fusión del ADN fue de 85 ºC, correspondiendo con la observada en el trabajo de Li *et al.* (2017) (132).

a) Calibración de la técnica de cuantificación de *mcr-1* por PCR a tiempo real

Dado que el objetivo con el que se utilizó esta técnica fue el de cuantificar las copias de *mcr-1* presentes en cada muestra, se procedió a la elaboración de una recta de estándares con concentraciones de ADN conocidas obtenidas a partir de diluciones de una cepa bacteriana empleada como control, empleando agua estéril como solvente. Para ello se extrajo el ADN a partir de la cepa de *E. coli* ZTA16/01760, portadora del gen *mcr-1* (previamente caracterizada), y se ajustó la concentración a 1 ng/µL (1×10^6 fg/µL). A continuación, se realizaron un total de 7 diluciones decimales (dilución 0 = 1×10^6 fg/µL; dilución -1 = 1×10^5 fg/µL; dilución -2 = 1×10^4 fg/µL; dilución -3 = 1×10^3 fg/µL; dilución -4 = 1×10^2 fg/µL; dilución -5 = 1×10^1 fg/µL; dilución -6 = 1 fg/µL; y dilución -7 = 0,1 fg/µL). Estas diluciones se realizaron con el objetivo de determinar el límite de cuantificación del método de acuerdo con los valores óptimos de eficiencia de PCR (E), coeficiente de determinación (r^2) y la pendiente de la recta de estándares, la cual indica cantidad de ADN existente entre cada ciclo de amplificación (CT, del inglés *Cycle Threshold*) de los puntos que la componen, valores estrechamente relacionados entre sí. Una eficiencia del 100% se consigue cuando, a partir de una molécula de ADN, se producen dos nuevas por cada ciclo de PCR, aunque este porcentaje normalmente suele ser inferior, siendo aceptable unos valores comprendidos entre el 90% y el 100% de eficiencia (133, 134). El valor de r^2 es una medida que refleja la aproximación de los datos replicados en una línea de ajuste, informando sobre la reproducibilidad del ensayo.

Para la elaboración de la recta de estándares, cada reacción de PCR se hizo por triplicado, empleando los cebadores y las condiciones anteriormente descritas. Finalmente, se calculó el número de copias de *mcr-1* por microlitro de muestra mediante la siguiente fórmula (135):

$$Nº\ copias = \frac{\left[ng\ ADN\ x\ \left(6{,}023x10^{23}\ \frac{moléculas}{mol}\right)\right]}{nº\ bases\ (template)x10^{9}\ \frac{ng}{mol}\ x\ 660\ \frac{g}{mol}}$$

Donde:

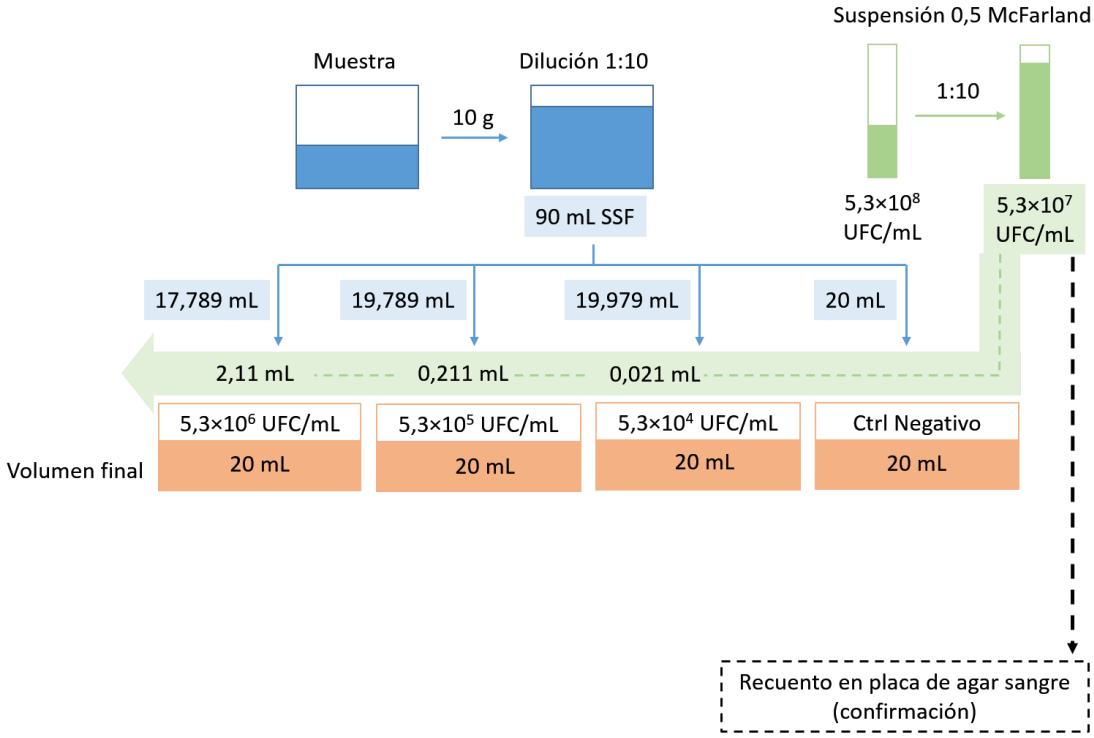
- Nº copias = número de copias de *mcr-1*.
- ng ADN = nanogramos de ADN obtenidos en la reacción de PCR.
- nº bases (*template*) = número de bases del genoma donde se encuentra el gen. En este caso se ha empleado la media de los tamaños de los principales genomas bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* (4.700.000 pb) obtenidos en cribados previamente realizados en el centro VISAVET-UCM y que se recogen en sus bases de datos.

3.2.2.4. Evaluación de la reproducibilidad de la técnica de qPCR para la cuantificación de *mcr-1* en muestras cecales

Para evaluar la aplicabilidad de la técnica en muestras de contenido cecal, se llevó a cabo un ensayo de contaminación artificial tal como se detalla en el esquema de la figura 7. Para ello se utilizaron dos muestras de contenido cecal de cerdos (ZTA20/00423 y ZTA20/00424) que no habían sido tratados con colistina previamente. Se mezclaron 10 g de cada una y se recogieron 10 g, descartando la presencia del gen *mcr-1* mediante PCR. Las muestras fueron diluidas 1:10 en SSF en un volumen final de 100 mL y se dividieron en cuatro alícuotas denominadas A1, A2, A3 y A4. Tres de estas cuatro alícuotas (A1 a A3) fueron contaminadas con concentraciones decrecientes de la cepa de *E. coli* portadora de *mcr-1*, empleada anteriormente en la calibración de la técnica de qPCR (A1 = $5{,}3\times10^{6}$ UFC/mL; A2 = $5{,}3\times10^{5}$ UFC/mL; A3 = $5{,}3\times10^{4}$ UFC/mL; UFC: unidad formadora de colonias). Las concentraciones de las suspensiones bacterianas fueron calculadas a partir de una primera suspensión bacteriana con una densidad óptica de 0,5 en la escala McFarland, la cual reflejó un recuento en placa de $5{,}3 \times 10^{7}$ UFC/mL. La alícuota restante (A4), fue utilizada como control negativo.

En todas las muestras cecales, se realizó la extracción directa de ADN y posterior ensayo de qPCR para la cuantificación del gen *mcr-1* siguiendo las mismas condiciones anteriormente descritas (apartado 3.2.2.3).

Figura 7. Diseño del ensayo de validación del protocolo para la detección de *mcr-1* en muestras de contenido cecal.



Los cuadros sombreados en azul indican los volúmenes extraídos de la dilución inicial de la muestra a contaminar (90 mL) necesarios para obtener un volumen final de 20 mL por alícuota (sombreados en naranja), teniendo en cuenta las cantidades de inóculo (sombreados en verde) necesarias para cada una de ellas.

3.2.3. Secuenciación completa del genoma

3.2.3.1. Secuenciación de lectura corta (*short-read sequencing*)

En la presente tesis doctoral se emplearon dos protocolos de secuenciación de lectura corta con la tecnología de *Illumina*, que fueron llevados a cabo por el Instituto Tecnológico Agrónomo de Castilla y León (ITACyL) y el *Quadram Institute* (QI) de Norwich.

En el protocolo de ITACyL, la extracción del ADN bacteriano se llevó a cabo mediante el kit de extracción QIAGEN *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Valencia). La preparación de las librerías para la secuenciación del genoma se hizo usando el kit Nextera XT y la secuenciación se realizó con el equipo Illumina MiSeq (San Diego, CA, EE.UU). Tanto la extracción de ADN, como la secuenciación de los genomas, se llevaron a cabo en este centro.

En el protocolo empleado en el QI la extracción del ADN bacteriano se realizó con el kit *Wizard® HMW DNA Extraction Kit* (*Promega Corporation*, Madison, Estados Unidos). Una vez extraído, se comprobó la concentración de ADN en un fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, MA, Estados Unidos) y, posteriormente, todas las muestras fueron normalizadas a 10 ng/µL. Las librerías fueron preparadas usando el método Nextera *DNA Flex* (Illumina® *DNA Prep*, *Tagmentation* 20018704) y la secuenciación se realizó con un equipo Illumina HiSeq (San Diego, CA, EE.UU). Una vez obtenidas las secuencias de los genomas, se llevó a cabo un análisis de calidad y filtrado de lecturas de baja calidad empleando los programas FastQC v0.11.9 y Trimmomatic v0.39.

3.2.3.2. Secuenciación de lectura larga (*long-read sequencing*)

Este tipo de secuenciación se llevó a cabo en el QI durante el periodo de estancia internacional realizada en el Reino Unido, utilizando la tecnología de Oxford Nanopore (ONT). La extracción del ADN bacteriano se realizó con el protocolo empleado para la secuenciación de lectura corta realizado en el QI. La preparación de las librerías de ADN se realizó con el *Nanopore ligation sequencing kit* SQK-LSK109 (*Oxford Nanopore Technologies*, Oxford, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprobaron los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos con el programa *Agilent* 2200 *TapeStation* (*Agilent Catalogue No.* 5067–5579) y, posteriormente, se tomaron 75 µL de las librerías (preparadas a partir de 400 ng de ADN) con los que se cargaron los canales de secuenciación R9.4 MinION *flow cell* (*Oxford Nanopore Technologies*, Oxford, Reino

Unido). Por último, la secuenciación se llevó a cabo con el equipo MinION™ (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido).

3.2.3.3. Procesado de genomas y análisis bioinformático

a) Secuenciación de lectura corta realizada en el ITACyL

Tanto la extracción de ADN, como la secuenciación de los genomas, se llevaron a cabo en el ITACyL. Una vez obtenidas las secuencias de los genomas, se llevó a cabo un análisis de calidad y filtrado de lecturas de baja calidad empleando los programas FastQC v0.11.9 y Trimmomatic v0.39. Posteriormente, se realizó su ensamblado utilizando SPAdes v13.0.0 (136) y se procedió a la anotación de los genomas con Prokka v1.14.6 (137). Por último, tanto el análisis del resistoma como la determinación de posibles estructuras plasmídicas, se llevó a cabo empleando ABRicate (138), que utiliza la herramienta BLASTn para comparar las secuencias de los genomas, en este caso, con las bases de datos ResFinder (139) y PlasmidFinder (140).

b) Secuenciación llevada a cabo durante la estancia en el Reino Unido

La secuenciación de los genomas bacterianos llevada a cabo durante la estancia en el Reino Unido se llevó a cabo combinando la secuenciación de lectura corta y la de lectura larga. Estas técnicas fueron realizadas en el QI de Norwich, mientras que el procesado de secuencias y correspondiente análisis bioinformático se completó en el *London School of Hygiene and Tropical Medicine* (LSHTM) de Londres.

Tras el proceso de secuenciación de lectura corta, se llevó a cabo un análisis de calidad y filtrado de lecturas de baja calidad con los mismos programas indicados en el apartado anterior. En la secuenciación de lectura larga, una vez finalizado el proceso de secuenciación, se procedió a la transformación de las señales derivadas de cada lectura en el secuenciador a un archivo de texto con la secuencia de bases que las componían (*basecalling*) mediante el programa Guppy v3.2.2, específico para secuencias obtenidas por secuenciación ONT. Las secuencias de ADN obtenidas se filtraron con el programa Filtlong v0.2.1 para descartar lecturas de mala calidad. Para evitar eliminar la posible presencia de plásmidos de pequeño tamaño, se hizo un filtrado suave de tal forma que se conservasen todas las lecturas de tamaño mayor a 1 kb.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de los genomas bacterianos, se llevó a cabo el ensamblado híbrido de cada genoma, es decir, se utilizaron las lecturas derivadas de la secuenciación realizada, tanto por la tecnología Illumina como por ONT, para obtener una mayor precisión en la reconstrucción de cada genoma. Para ello se utilizó el programa Unicycler v0.4.8. Este programa utiliza SPAdes v3.13.0 (141) para ensamblar las lecturas cortas de Illumina, así como Miniasm y Racon, los cuales emplean los grafos del anterior ensamblaje y las lecturas largas de ONT para corregir imprecisiones llevando a cabo múltiples rondas de limpieza y ajuste para aumentar la precisión de los ensamblajes. Una vez ensamblados los genomas, se llevó a cabo la reconstrucción de los plásmidos que pudiese albergar cada aislado, además de diferenciarlos y separarlos del cromosoma bacteriano con el programa MOB-suite v3.1.0 (142). Este programa identifica las estructuras plasmídicas empleando el método de tipado MOB, un esquema de tipado de plásmidos basado en la identificación del tipo de relaxasa presente en cada estructura. Además, MOB-suite predice la movilidad del plásmido en función de la presencia de tres elementos: origen de transferencia (*oriT*), *mate-pair formation* (MPF) y relaxasa (módulo MOB). Así, este programa clasifica los plásmidos como "conjugativos" si contiene al menos una relaxasa y MPF; "movilizables" si contienen relaxasa u *oriT*, pero carecen de MPF; y "no movilizables" si carecen tanto de relaxasa como de *oriT* (142).

A continuación, se utilizó el programa ABRicate v1.0.1 (138), empleando la base de datos de Plasmidfinder (140), para la determinación del tipo de plásmido en función del replicón identificado y el programa AMRFinderPlus v3.10 (143), para realizar un *screening* masivo de los genes de resistencia a antimicrobianos codificados en los *contigs* que componían cada plásmido y el cromosoma bacteriano. Por último, se realizó la anotación de los genes de cada plásmido con el programa Prokka v1.14.6 (137) y el servidor web Pannzer2 (144), que emplea la base de datos Pfam (*protein families database*) para comparar y obtener la función de las proteínas identificadas (145).

c) Visualización de los genomas derivados del ensamblaje híbrido

Tras la anotación de los genomas ensamblados, se llevó a cabo su visualización mediante el programa Artemis v18.2.0 (146) para completar el análisis del entorno genético de los genes *mcr*, así como otras estructuras de interés, como ISs, transposones, genes de resistencia a otros

antimicrobianos o presencia/ausencia de relaxasas, MPF u *oriT* en el caso de estructuras plasmídicas.

Una vez localizados los elementos génicos de interés, se llevó a cabo la representación gráfica de los plásmidos en los que se localizaban genes *mcr* mediante la herramienta web Proksee (disponible en https://proksee.ca/).

En el caso de los genes *mcr* localizados en el cromosoma bacteriano y en plásmidos cuyo tipado no pudo llevarse a cabo, se realizó una representación gráfica de su entorno genético. Estas figuras fueron creadas empleando el entorno de programación en R v4.1.3, mediante la interfaz RStudio v3.3.0, con las herramientas gggenes v0.4.1 (147), ggplot2 (148) y dplyr v1.0.10 (149).

3.2.3.4. Selección de aislados empleada para la secuenciación completa del genoma

a) Aislados secuenciados en el ITACyL

En ITACyL se secuenciaron aislados de los ceparios RESCOL y COLR para confirmar o descartar la presencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en aquellos aislados portadores de genes *mcr* cuyo fenotipo indicase su posible presencia. También se aplicó en aislados con un perfil de resistencia que incluyese, de forma conjunta, genes de resistencia a antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana, según lo estipulado por la OMS (150), incluidos en el panel de sensibilidad utilizado. Por último, se secuenciaron los aislados en los se detectaron mediante PCR tradicional los genotipos *mcr* menos comunes como *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, y *mcr-5*.

b) Aislados secuenciados durante la estancia en el Reino Unido

Se seleccionaron aislados de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos a partir de muestras de contenido cecal de ganado porcino entre los años 1998 y 2021. Además de los aislados disponibles en los ceparios RESCOL y COLR, se cribaron las colecciones de cepas de *E. coli* indicador del centro VISAVET-UCM anteriores al año 2010, tratando de detectar las bacterias más antiguas con genes *mcr*. Se escogieron las colecciones de *E. coli* por ser la especie más numerosa en los ceparios RESCOL y COLR, así como en los ceparios del centro.

Los aislados fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios para su inclusión en el estudio:

1) Fenotípicamente resistentes a colistina y con CMI superior a 2 mg/L.
2) Con genes de resistencia a colistina de la familia *mcr*, independientemente del genotipo identificado.
3) Año de aislamiento.

Se seleccionaron de forma aleatoria hasta 15 aislados por año de muestreo, si los hubiese. Además, dado que los aislados portadores de genes *mcr* de variante distinta a *mcr-1* (*mcr-2* a *mcr-10*) disponibles eran escasos, se decidió incluir todos los disponibles (20 aislados), con el fin de asegurar la presencia del mayor número de variantes posibles (16 *mcr-4*, dos *mcr-2*, un *mcr-3* y un *mcr-5*). De esta forma, se incluyeron un total de 123 enterobacterias de diferentes especies, portadoras de diferentes variantes de genes *mcr* (tabla 4).

Tabla 4. Distribución por especies de los aislados secuenciados en QI (secuenciación de lectura corta y larga) en función de la presencia de genes de la familia *mcr.*

Especie	*mcr-1*	*mcr-2*	*mcr-4*	*mcr-5*	*mcr-1/mcr-3*	*mcr-1/mcr-4*	Total
E. coli	102	2	8	1	1	2	116
Escherichia fergusonii	-	-	2	-	-	-	2
Raoultella ornithinolytica	-	-	2	-	-	-	2
K. pneumoniae	-	-	1	-	-	-	1
Citrobacter freundii	-	-	1	-	-	-	1
C. youngae	1	-	-	-	-	-	1
Total	103	2	14	1	1	2	123

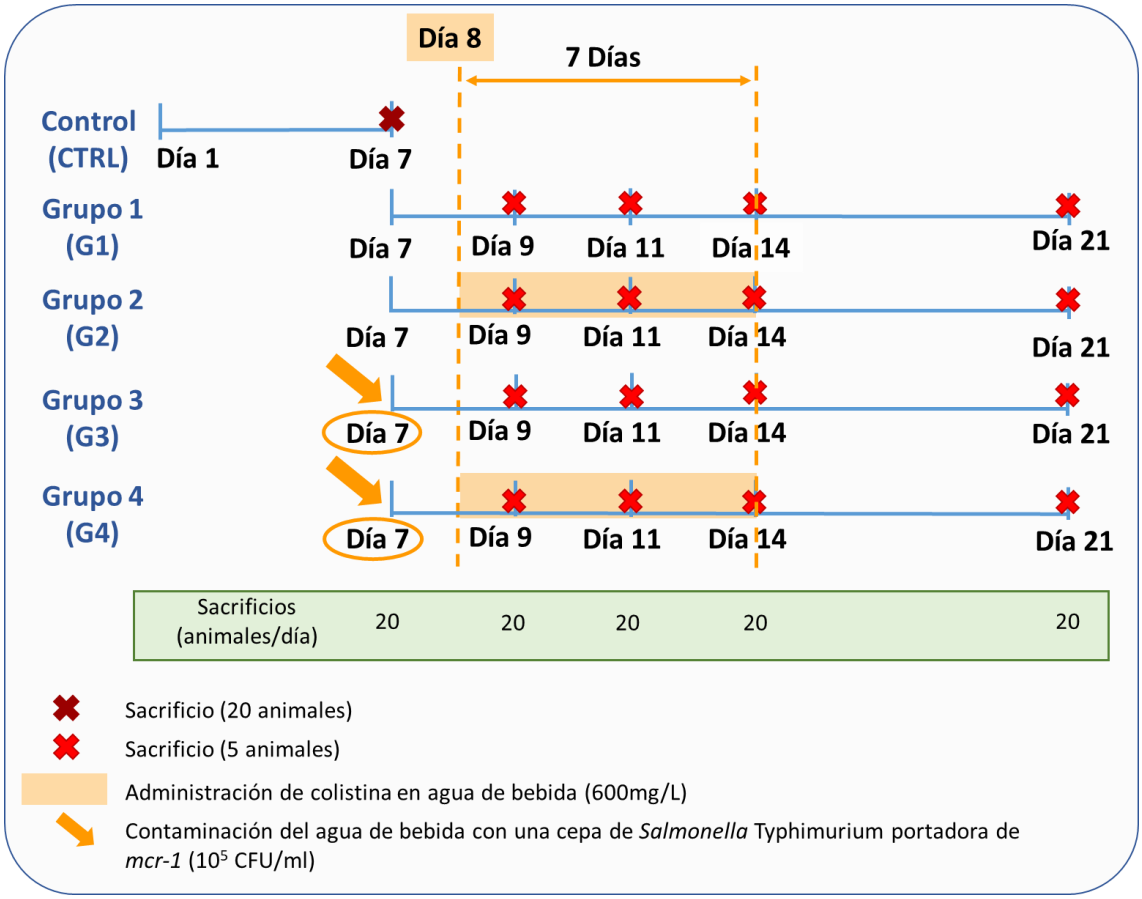
3.2.4. Estudio experimental: análisis de la capacidad de diseminación de las cepas resistentes a colistina portadoras del gen *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina

3.2.4.1. Diseño experimental

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de bioseguridad NCB3 del Centro VISAVET-UCM, que dispone de un animalario con tres boxes individualizados con climatización y acceso independiente que permitió la realización simultánea de distintos ensayos con animales. Los procedimientos experimentales realizados fueron aprobados por el Comité de Ética y Cuidado animal de la Universidad Complutense de Madrid (fecha de aprobación: 31/07/2019; número de registro: 99/107262.9/19) en conformidad con las regulaciones de la Comunidad de Madrid (PROEX 152/19). Para llevar a cabo este ensayo se emplearon 100 pollos de la estirpe Ross 308 de un día de vida, obtenidos a partir de una granja comercial (incubadora). Todos los animales se criaron en las instalaciones del centro VISAVET-UCM durante 21 días, siguiendo la normativa europea de bienestar animal (Directiva 2010/63/UE (151)). La alimentación y el agua de bebida fueron administradas *ad libitum* y se establecieron las mismas condiciones ambientales y de luz que las descritas previamente por Herrero Encinas *et al.* (2019) (152): 33 ^{o}C en la primera semana de vida de los animales, reduciendo 2 ^{o}C cada semana; 23 horas de luz y una de oscuridad en la primera semana de vida y, a partir de entonces, 18 horas de luz y 6 de oscuridad hasta finalizar el ensayo.

La ejecución del estudio (procedimientos de manejo y toma de muestras de los animales), que se resume en la figura 8, se llevó a cabo teniendo en cuenta todas las condiciones establecidas por el comité de ética de acuerdo a la legislación vigente y respetando las normas de bienestar animal.

Figura 8. Diseño experimental del ensayo *in vivo* en broilers.



Todos los animales hasta el día 7 fueron considerados como un mismo grupo para el análisis de datos como grupo control (CTRL), por lo que en el muestreo del día 7 se incluyeron 20 animales.

Para estudiar el comportamiento del gen *mcr-1*, se administró vía oral, a una parte de los animales, una bacteria portadora del gen aislada a partir de esta especie animal. Concretamente se utilizó la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium variante monofásica (ZTA14/00045), resistente a colistina y previamente caracterizada, en la que se detectó la presencia del gen *mcr-1* en un plásmido conjugativo de tipo IncHI2 (194 kbp de tamaño).

En primer lugar, se analizó la presencia de *Salmonella* spp. en los pollos de un día de vida al llegar al Centro VISAVET-UCM siguiendo el protocolo establecido por la norma ISO 6579-1:2017/A1:2021 (153). Los animales se dividieron en cuatro grupos de 25 individuos que fueron, siendo criados en cuatro jaulas separadas durante todo el estudio. Hasta el día 7 todos los grupos tuvieron las mismas condiciones ambientales y de alimentación, por lo que todos los animales

hasta el día 7 (primera intervención) fueron considerados como grupo control (CTRL). A partir del día 7, los pollos de cada jaula fueron expuestos a diferentes condiciones diferenciando desde entonces cuatro nuevos grupos:

- **Grupo 1 (G1):** grupo sin ninguna intervención.
- **Grupo 2 (G2):** con administración de colistina en agua de bebida.
- **Grupo 3 (G3):** con administración de agua contaminada con la cepa de *S.* Typhimurium variante monofásica portadora del gen *mcr-1*.
- **Grupo 4 (G4):** con administración en agua de la cepa de *S.* Typhimurium variante monofásica portadora del gen *mcr-1* en el día 7 y de colistina en el día 8.

Con el objetivo de evitar contaminaciones cruzadas, los grupos de animales fueron distribuidos a su llegada al centro en dos boxes independientes al inicio del estudio, separando así los grupos expuestos a la cepa de *Salmonella* spp. (G3 y G4) de los grupos no expuestos (G1 y G2), manteniendo, además, los pollos de cada grupo en jaulas separadas. Tras un periodo de adaptación de los animales al entorno en que se iban a criar, los pollos de los grupos G3 y G4 recibieron por vía oral al séptimo día de vida la cepa de *Salmonella* spp. a través del agua de bebida a una concentración de $3{,}3\times10^5$ UFC/mL.

La administración de colistina en forma de sulfato de colistina 1.025.000 UI (Acolan, España) se llevó a cabo en los grupos G2 y G4 a través del agua de bebida. Se ajustó la concentración a 75.000 UI, que es la recomendada por la EMA para la administración del antimicrobiano en aves de corral (3), utilizando una dosis de 600 mg/L durante siete días, iniciados un día después de la administración del inóculo de *Salmonella* spp. (día 8), reemplazando el agua de bebida cada 24 horas.

Se llevaron a cabo cinco muestreos en los días 7, 9, 11, 14 y 21 de estudio, correspondientes a los 8, 10, 12, 15 y 22 días de vida de los animales, respectivamente. En cada muestreo se eutanasiaron con sobredosis de pentobarbital sódico, administrado mediante inyección intraperitoneal, cinco animales de cada grupo (figura 8), aleatoriamente seleccionados. Se recogieron muestras (1,5 g contenido cecal) durante las necropsias que fueron refrigeradas a 4 ^{o}C para su procesamiento en las siguientes 24 horas. El resto de contenido cecal fue recogido y almacenado a -80 ^{o}C.

3.2.4.2. Análisis realizados

a) Cuantificación de *Salmonella* spp. en medio selectivo

En primer lugar, se diluyó 1 gramo de muestra fresca almacenada en refrigeración en 2 mL de SSF y se homogenizó la mezcla. Después, se tomaron 50 µL de esta solución y se añadieron a 9 mL de BHI suplementado con un disco de 10 µg de colistina, incubando durante 4 horas a 37 ºC. Tras el periodo de incubación, se realizaron cuatro diluciones decimales a partir de la primera dilución en BHI y se sembraron 100 µL de las diluciones -3 y -4 en placas *ChromID® Salmonella* SMID2 (*bioMérieux*, Francia), que fueron incubadas durante 24 horas a 37 ºC. Tras la incubación, se contaron las UFCs sospechosas de ser *Salmonella* spp. (colonias de color rosa-malva según las instrucciones del fabricante), asumiendo que todas las colonias detectadas de *Salmonella* spp. procedían de la cepa inoculada. Los resultados se expresaron en UFC/mg de muestra, teniendo en cuenta el límite de detección del medio, el cual se estableció en $5{,}5\times10^3$ UFC/g de muestra.

Para confirmar la presencia de *Salmonella* spp., se tomó una colonia por placa y se subcultivó de nuevo en AS para la obtención de un cultivo puro. A partir de este, se llevó a cabo las confirmaciones de especie, mediante MALDI TOF/TOF, y de la presencia del gen *mcr-1*, mediante PCR convencional, empleando para ello el protocolo detallado en el apartado 3.2.2.1. Estos análisis se realizaron con el fin de confirmar que la cepa de *S.* Typhimurium variante monofásica (portadora del gen) había sido inoculada con éxito en todos los animales, asumiendo que el resto de las colonias obtenidas en la placa de SMID2 tenían la misma procedencia.

b) Cuantificación del gen *mcr-1* mediante qPCR

La cuantificación del número de copias de *mcr-1* presentes en las muestras de contenido cecal de los animales en estudio se llevó a cabo por PCR a tiempo real, empleando el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.3. Las muestras fueron consideradas positivas al gen *mcr-1* cuando mostraban un valor de cuantificación superior a 10^2 fg/µL (equivalente a $1{,}58 \times 10^3$ copias/mg de contenido cecal).

c) Cuantificación de *Salmonella* spp. mediante qPCR

Para llevar a cabo la cuantificación por PCR de *Salmonella* spp. en las muestras de contenido cecal obtenidas de cada animal se usó el kit comercial *Salmonella spp. DNA extraction and real-time PCR detection (Kylt® Salmonella spp. (FS), Oldenburg*, Alemania). Se utilizaron 2 µL de cada muestra de ADN eluido y se llevó a cabo cada reacción de PCR por triplicado. En este caso, la PCR a tiempo real se basó en el uso de sondas específicas FAM para la detección de *Salmonella* spp. y HEX como control interno de PCR (la secuencia de las sondas y cebadores utilizados no se encuentran disponibles al ser propiedad del fabricante). El establecimiento de la recta de estándares para la cuantificación de *Salmonella* spp. presente en cada muestra se llevó a cabo siguiendo el esquema descrito en el apartado 3.2.2.3, en este caso sobre el marcador FAM en vez de *SYBR Green*. El protocolo de PCR que se empleó fue el siguiente: un ciclo de 95 ^{o}C durante 10 minutos, 42 ciclos de 95 ^{o}C durante 15 segundos y 60 ^{o}C durante 1 minuto. El ensayo se consideró válido si se cumplían las siguientes condiciones, tal y como describen las instrucciones del fabricante:

- La curva FAM del control negativo era negativa.
- La curva HEX del control negativo era positiva y se encontraba entre los ciclos (CTs) 10 y 40 (inclusive).
- La curva FAM del control positivo era positiva y se encontraba entre los ciclos (CTs) 15 y 35 (inclusive).

Finalmente, una muestra se consideró positiva si mostraba un ciclo de amplificación (CT) inferior a 42, tal y como indicaba el fabricante.

3.3. Análisis estadístico

Para analizar y comparar la diversidad de géneros bacterianos obtenidos a partir de los cultivos de las muestras de 2018, tanto frescas como congeladas (apartado 4.3.1), se utilizó el índice de Shannon-Weaver (H') (154):

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} p_i \ln p_i$$

Donde *i* hace referencia a los géneros y p_i es el resultado de $p_i = ni/N$, siendo *ni* el número total de organismos de un género concreto y *N* es el total de organismos incluyendo todos los géneros. Cuanto mayor es el valor de H', mayor es la diversidad que presenta la población en estudio, por lo que, un valor de H' = 0 indica que la población está compuesta por un solo género bacteriano. Además, se emplearon intervalos de confianza del 95% (IC95%) para comparar los índices de diversidad calculados en el apartado 4.3.1.

Para comparar los valores de H' entre los conjuntos de datos analizados se calculó el índice de uniformidad (*e*) propuesto por Pielou en 1966 (155):

$$\mathrm{e} = H'/H'_{max}$$

Donde H'_{max} es el valor máximo de diversidad que puede alcanzar un determinado conjunto de datos y es el resultado de $H'_{max} = ln\ S$, donde *S* es, en este caso, el número total de géneros bacterianos identificados en cada conjunto de datos (muestras frescas y muestras congeladas). El índice de uniformidad alcanza valores comprendidos entre 0 y H'_{max}, por lo que índices cercanos a este valor serán indicativos de poblaciones muy diversas y, en cambio, valores más cercanos a 0, de poblaciones poco diversas.

Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar la proporción de aislados bacterianos portadores del gen en muestras frescas y muestras congeladas obtenidos mediante técnicas de cultivo tradicional. Se determinó que el crecimiento de al menos un aislado portador de *mcr-1* era suficiente para considerar la muestra como "positiva".

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para la comparación de las frecuencias de muestras *mcr-1* positivas observadas por año.

Para el análisis de los resultados cuantitativos de qPCR se utilizó la Prueba-T para dos muestras relacionadas. Los datos fueron normalizados previamente mediante su transformación en logaritmos en base 10 (Log_{10}).

Para medir el grado de acuerdo entre dos métodos se utilizó el índice kappa (κ) (156).

Para el análisis de los recuentos de UFC de *Salmonella* spp. en medio SMID2 se empleó la prueba de Kruskal-Wallis.

Todas las pruebas estadísticas se consideraron significativas si el valor p era inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de aislados resistentes a colistina

4.1.1. Cepario RESCOL

4.1.1.1. Ampliación del cepario RESCOL

A partir de las muestras de contenido cecal de ganado porcino y bovino de 2017 se obtuvieron, mediante el protocolo MCK-COL, 80 aislados de enterobacterias (73 *E. coli*, tres *C. youngae*, un *C. freundii*, dos *E. cloacae* y un *E. asburiae*), los cuales se añadieron a los 163 aislados que componían inicialmente el cepario RESCOL (tabla 5).

Tabla 5. Distribución por muestra y especie animal de los 80 aislados del cepario RESCOL obtenidos mediante el protocolo MCK-COL.

Muestras de animales				
Año	**Especie animal**	**Tipo de muestra**	**Nº de aislados**	**Género/Especie**
2017	Lechón	Hisopo rectal	12	*E. coli*
2017	Bovino	Heces	2	*E. coli*
2017	Porcino	Heces	59	*E. coli*
2017	Porcino	Heces	1	*C. freundii*
2017	Porcino	Heces	3	*C. youngae*
2017	Porcino	Heces	1	*E. asburiae*
2017	Porcino	Heces	2	*E. cloacae*
Total (aislados)			**80**	

Por tanto, el cepario RESCOL se compuso, finalmente, de 243 aislados de 12 especies/géneros bacterianos diferentes, obtenidos entre los años 2006 y 2017, de las cuales *E. coli* y *Salmonella enterica* eran las dos especies más abundantes, representando el 82,7% (201/243) y el 13,2% (32/243) del total, respectivamente.

4.1.1.2. Determinación de la CMI frente a colistina

Entre los 243 aislados del cepario RESCOL el valor más frecuente de CMI (tabla 6) fue 4 mg/L, observado en el 79,4% de los aislados (193/243) pertenecientes a diferentes especies bacterianas (168 *E. coli*, 23 *S. enterica* y dos *C. youngae*) (tabla 6). Además, tres aislados de *E. coli* presentaron valores de CMI de 2 mg/L. Estos aislados se consideraron como resistentes debido a que fueron obtenidos a partir de medio selectivo con colistina y, además, presentaban genes *mcr*, que fueron detectados por PCR (apartado 4.1.1.3).

Tabla 6. Distribución de los valores de CMI frente a colistina de los 243 aislados que componen el cepario RESCOL.

Especie bacteriana	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L	16 mg/L	>16 mg/L	Total
E. coli	3	168	30	-	-	201
S. enterica	-	23	9	-	-	32
E. asburiae	-	-	-	-	2	2
E. cloacae		-	-	-	2	2
E. kobei		-	-	-	1	1
C. freundii		-	1	-	-	1
C. youngae		2	1	-	-	3
K. pneumoniae		-	1	-	-	1
Total	3	193	42	0	5	243

La distribución de valores de CMI no parecía tener relación directa con la especie bacteriana, salvo en el caso de los cinco aislados de *Enterobacter* spp. (*E. asburiae*, *E. cloacae* y *E. kobei*), los cuales presentaron valores superiores a 16 mg/L, indicando que estas especies contaban con un nivel de resistencia a colistina superior al resto de aislados incluidos en el cepario RESCOL.

4.1.1.3. Determinación del perfil de resistencia

De los 243 aislados que componen el cepario RESCOL, el 91,8% eran resistentes a ampicilina (223/243), el 87,7% a sulfametoxazol (213/243), el 86,8% a tetraciclina (211/243), el 70,0% a cloranfenicol (170/243), el 70,0% a ácido nalidíxico (170/243) y el 67,5% a trimetoprim (164/243). El resto de los antimicrobianos obtuvieron porcentajes de resistencia menores al 30%. El 99,8%

(241/243) eran multirresistentes, presentando resistencia a una media de seis familias de antimicrobianos, incluyendo polimixinas, mientras que los dos aislados restantes presentaron resistencia, además de a colistina, uno a tetraciclina y el otro a ácido nalidíxico. Los resultados de CMI para cada antimicrobiano incluido en el panel de sensibilidad se encuentran disponibles en la tabla IV del anexo II.

Se observaron 92 perfiles de resistencia distintos. Los dos perfiles más frecuentes mostraban resistencia a seis y a nueve antimicrobianos, observándose cada uno de ellos en 17 aislados: COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL (17/243; 7,0%) y COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-AZI- (17/243; 7,0%) respectivamente.

Atendiendo a la distribución por especies bacterianas, *E. coli*, especie con mayor representación en el cepario RESCOL (201/243), presentó una gran variabilidad de perfiles de resistencia, identificándose hasta 77 distintos, todos ellos multirresistentes, de los cuales los más frecuentes fueron:

- COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-AZI (17 aislados)
- COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL (15 aislados)
- COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-AZI-FOT-TAZ (14 aislados)
- COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL (14 aislados)

Además, tres aislados de esta especie, obtenidos en 2015, mostraron un perfil de resistencia COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-GEN-AZI-FOT-TAZ que abarcaba la mayoría de los antimicrobianos incluidos en el panel (12/14 antimicrobianos), dos de ellos procedentes de muestras de porcino y uno de bovino. El resto de los perfiles, observados en menos de ocho aislados cada uno, se resumen en la tabla VI del anexo III.

En *S. enterica*, segunda especie con mayor representación en el cepario RESCOL (32/243), se identificaron 15 perfiles de resistencia distintos, de los cuales 13 fueron multirresistentes y observados en el 91% de los aislados (29/32). El perfil más frecuente implicaba tres antimicrobianos (COL-SMX-NAL) y fue identificado en 14 aislados. El resto de perfiles se observaron en menos de tres aislados cada uno, resumiéndose en la tabla VI del anexo III.

En cuanto al resto de especies bacterianas, todos los perfiles observados fueron de multirresistencia. Los perfiles cuyas resistencias afectaban a un mayor número de antimicrobianos

fueron observados en las especies del género *Enterobacter* spp. (cinco aislados), abarcando de ocho a 10 antimicrobianos. A continuación, se detallan los perfiles obtenidos en estos dos géneros:

- *K. pneumoniae:* COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL (un aislado).
- *E. asburiae*:
    - COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-AZI-FOT-TAZ (un aislado).
    - COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-GEN (un aislado).
- *E. cloacae*:
    - COL-AMP-TET-SMX-TMP-CIP-NAL-AZI-FOT (un aislado).
    - COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-AZI-TAZ (un aislado).
- *E. kobei*: COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-GEN- TAZ (un aislado).

En cambio, las especies de *Citrobacter* spp. presentaron perfiles semejantes a los observados en los aislados de *Salmonella* spp., comprendiendo entre cinco y siete antimicrobianos a los que eran resistentes.

- *C. freundii*: COL-AMP-TET-CIP-NAL-AZI-TAZ (un aislado).
- *C. youngae*:
    - COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL (dos aislados).
    - COL-AMP-TET-SMX-TMP (un aislado).

4.1.1.4. Detección de genes de resistencia a colistina de la familia *mcr*

El 85,2% (207/243) de los aislados eran portadores de al menos un gen de la familia *mcr* (*mcr-1* a *5*) (tabla 7). Atendiendo a los resultados por especie, el 78,1% de los aislados de *E. coli* (153/201) presentaron el gen *mcr-1* y el 20,9%, el *mcr-4* (39/201). Además, el aislado portador de *mcr-3/mcr-1,* así como los tres casos de concurrencia *mcr-1*/*mcr-4,* también pertenecían a esta especie bacteriana. Los cinco aislados restantes no presentaron genes *mcr* (tabla7).

Tabla 7. Detección de genes de la familia *mcr* en los aislados resistentes a colistina del cepario RESCOL (N = 243).

Especie	Nº total aislados	*mcr-1*	*mcr-1/ mcr-3*	*mcr-4*	*mcr-1/ mcr-4*	*no mcr*	Total
S. enterica	32	7	-	-	-	25	32
E. coli	201	153	1	39	3	5	201
K. pneumoniae	1	-	-	-	-	1	1
E. asburiae	2	-	-	-	-	2	2
E. kobei	1	-	-	-	-	1	1
E. cloacae	2	1	-	-	-	1	2
C. youngae	3	1	-	2	-		3
C. freundii	1	-	-	-	-	1	1
Total	243	162	1	41	3	36	243

En el caso de *Salmonella* spp., en cambio, la mayoría de los aislados no portaban genes *mcr* (25/32; 78%) y tan solo siete de los 32 aislados presentaron el gen *mcr-1* (22%), no habiéndose detectado el resto de genotipos (*mcr-2* a *mcr-5*) en este género.

El resto de especies bacterianas que componían el cepario fueron cuatro aislados de *Citrobacter* spp., dos de los cuales presentaban el gen *mcr-4* (*C. youngae*), uno el gen *mcr-1* (*C. youngae*) y uno no portaba genes *mcr* (*C. freundii*); cinco aislados de *Enterobacter* spp. (dos aislados de *E. asburiae*, dos de *E. cloacae* y otro de *E. kobei*), uno de ellos portador de *mcr-1* (*E. cloacae*), mientras que el resto no presentaban genes *mcr*; y, por último, un aislado de *K. pneumoniae* con resultado negativo a la PCR de presencia de genes *mcr*.

4.1.2. Cepario COLR: muestreos realizados en ganado porcino

4.1.2.1. Aislamiento e identificación de enterobacterias resistentes a colistina del cepario COLR

De las 940 muestras de contenido cecal de porcino analizadas mediante cultivo bacteriano, en 616 (65,5%) se observó crecimiento bacteriano, siendo más frecuente la detección de dos morfologías diferentes por muestra. En total se obtuvieron 1.144 aislados en medio COLR (tabla 8).

Tabla 8. Distribución de muestras de contenido cecal de ganado porcino según el número de morfologías que presentaban las colonias bacterianas observadas en medio de cultivo COLR y el año de muestreo.

Año	Muestras con tres morfologías	Muestras con dos morfologías	Muestras con una morfología	Muestras sin crecimiento	Total muestras	Total aislados
2010	-	-	3	47	**50**	3
2011	-	-	2	48	**50**	2
2012	-	6	6	38	**50**	18
2013	-	2	7	41	**50**	11
2015	3	12	9	26	**50**	42
2017	-	4	10	36	**50**	18
2018	67	106	73	26	**272**	486
2019	43	98	72	30	**243**	397
2021	20	34	39	32	**125**	167
Total	133	262	221	324	**940**	**1144**

En 42 de estos aislados COLR (36 *E. coli*, tres *Aeromonas hydrophila* y tres *K. pneumoniae*) los valores de CMI eran inferiores a 2 mg/L (anexo II, tabla V), considerándose como falsos positivos y, por tanto, siendo excluidos de los análisis llevados a cabo en esta tesis doctoral. Al igual que sucedió en el cepario RESCOL, tres aislados que presentaron una CMI de 2 mg/L fueron incluidos en la colección y fueron considerados resistentes a colistina una vez que se confirmó la presencia de genes *mcr*, tal y como se detalla en el apartado 4.1.2.4. Así, la colección de aislados obtenida a partir de los muestreos en porcino (colección COLR) constó, finalmente, de 1.102 aislados resistentes a colistina.

De los 1.102 aislados el 50,3% (554/1.102) pertenecía a géneros naturalmente sensibles a colistina (ACRB), mientras que el 49,7% (548/1.102) restante fueron aislados de géneros bacterianos naturalmente resistentes a colistina (NCRB) (tabla 9). Ente los aislados ACRB, se observó una clara predominancia de *E. coli*, suponiendo el 85,7% (475/554). El segundo lugar lo ocupó *K. pneumoniae* con el 4,9% de los aislados (27/554), mientras que el resto de las especies bacterianas identificadas mostraron porcentajes inferiores al 3%.

Tabla 9. Especies bacterianas resistentes a colistina aisladas a partir de muestras de contenido cecal de ganado porcino.

Aislados obtenidos a partir del muestreo en porcino (ACRB+NCRB) (n = 1.102)			
Bacterias con Resistencia Adquirida a Colistina (ACRB)[1]		**Bacterias Naturalmente Resistentes a Colistina (NCRB)[1]**	
Especie	**Nº total aislados ACRB (%)**	**Especie**	**Nº total aislados NCRB (%)**
E. coli	475 (85,7)	*Providencia* spp.	282 (51,5)
K. pneumoniae	27 (4,9)	*Proteus* spp.	211(38,5)
R. ornithinolytica	12 (2,2)	*M. morganii*	45 (8,2)
C. freundii	9 (1,6)	*Ralstonia pickettii*	5 (0,9)
E. fergusonii	9 (1,6)	*Elisabethkingia meningoseptica*	1 (0,2)
E. cloacae	5 (0,9)	*Hafnia alvei*	1 (0,2)
E. asburiae	5 (0,9)	*Myroides odoratimimus*	1 (0,2)
A. hydrophila	3 (0,5)	*S. marcescens*	1 (0,2)
Klebsiella oxytoca	3 (0,5)	*Vibrio albensis*	1 (0,2)
C. youngae	2 (0,4)	**Total NCRB (%)**	**548 (49,7)[2]**
Citrobacter braaki	1 (0,2)		
Citrobacter amalonaticus	1 (0,2)		
Pasteurella aerogenes	1 (0,2)		
S. enterica	1 (0,2)		
Total ACRB (%)	**554 (50,3)[2]**		

[1] Número de aislados y, entre paréntesis, porcentaje de los mismos con respecto al total de aislados ACRB y NCRB, respectivamente. [2] Número de aislados y, entre paréntesis, porcentaje de los mismos con respecto al total de aislados obtenidos.

4.1.2.2. Caracterización del perfil de resistencia de los aislados ACRB

Más de la mitad de los 554 aislados mostraron un elevado porcentaje de resistencia frente a ampicilina (488/554, 88,1%), tetraciclina (468/554, 84,5%), sulfametoxazol (447/554, 80,7%), trimetoprim (429/554, 77,4%), cloranfenicol (369/554, 66,6%) y quinolonas (343/554, 61,9%), familia de antimicrobianos representada en el panel por el ácido nalidíxico (194/554, 35,0%) y el ciprofloxacino (343/554, 61,9%). El resto de los antimicrobianos presentaron porcentajes de resistencia inferiores al 25%.

De los 554 aislados ACRB resistentes a colistina, el 95,1% (527/554) era multirresistentes. Se identificaron 153 perfiles de resistencia diferentes (anexo III, tabla VII), en los que cada aislado, además de resistencia a colistina, presentaba resistencia también a otros grupos de antimicrobianos. Además, se observaron 27 aislados resistentes a colistina que no presentaban multirresistencia, de los que nueve solo mostraban resistencia frente colistina y, en el resto, frente a colistina unida sólo otra familia de antimicrobianos: quinolonas (ocho aislados), tetraciclinas (siete aislados), ampicilina (dos aislados) y trimetoprim y sulfametoxazol (un aislado resistente a ambos antimicrobianos).

Teniendo en cuenta las especies bacterianas que componen el cepario COLR, *E. coli* fue la especie más abundante con 475 aislados. De ellos, más del 50% presentaron sensibilidad reducida frente a ampicilina, tetraciclina, sulfametoxazol, trimetoprim, cloranfenicol o ciprofloxacino, mientras que menos de un 10% de los aislados fueron resistentes a ceftazidima o cefotaxima. Por último, no se observó resistencia a carbapenémicos en ninguno de los aislados. En la tabla 10 se indica la distribución de los valores de CMI frente a todos los antimicrobianos estudiados y los niveles de resistencia.

De estos 475 aislados el 93,1% (442/475) eran multirresistentes. Se identificaron 123 patrones de resistencia distintos (anexo III, tabla VII), de los cuales, el más frecuente fue COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL (seis antimicrobianos de cinco familias distintas), observado en 102 aislados. Además, más de la mitad (311/475, 65,6%) de los aislados de *E. coli* mostraron resistencia a seis o más antimicrobianos. Los valores de CMI más frecuentemente observados frente a colistina fueron 4 y 8 mg/L.

Tabla 10. Distribución de los valores de CMI frente a los 14 antimicrobianos incluidos en la prueba de sensibilidad de los 475 aislados de *E. coli* procedentes de las muestras de ganado porcino.

	CMI (µg/ml)																	
ATB	**≤0,015**	**0,015**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,25**	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**	**1024**	**>1024**
COL									2	4									
% R = 99,5									2	266	206	1							
NAL												16	32						
% R = 33,8									251	0	55	9	1	12	49	98			
AMP											8	16							
% R = 87,6							5	0	34	20	0	0	1	1	414				
AZI												16	32						
% R = 9,9								45	0	174	163	46	10	11	26				
FOT						0,25	0,5												
% R = 5,9					447	0	4	0	0	1	23								
TAZ							0,5	1											
% R = 5,5						448	1	6	3	3	4	10							
CIP				0,06	0,12														
% R = 60,5	161	0	24	3	7	95	81	15	9	7	8	65							
CHL												16	32						
% R = 68,1										142	2	8	76	65	86	96			
GEN									2	4									
% R = 32,9						267	0	48	4	3	18	47	37	51					
MER					0,12	0,25													
% R = 0,0		474	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0							

ATB	CMI (µg/ml)																		
	≤0,015	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
SMX														64	128				
% R = 80,6										11	0	41	28	13	4	1	0	6	371
TET											8	16							
% R = 81,4								51	16	12	9	17	89	280	1				
TGC								1	2										
% R = 0,21					449	0	24	1	0	1									
TMP									2	4									
% R = 77,8					80	1	19	4	1	1	0	1	3	365					

Las áreas en blanco indican el rango de diluciones empleado en cada antimicrobiano. Los valores por encima y por debajo del rango indican el número de aislados cuya CMI es superior a la última o inferior a la primera concentración del rango correspondiente, respectivamente. Las barras verticales indican el punto de corte aplicado para calcular los porcentajes de resistencia (% R), determinado por los valores presentes en la zona azul (en rojo, valor de CMI a partir del cual se considera que un aislado presenta resistencia frente a un determinado antimicrobiano).

A pesar de haber sido menos frecuente, otra especie a destacar por su importancia epidemiológica en medicina humana es *K. pneumoniae*, dada la creciente detección de aislados de esta especie productores de carbapenemasas.

Además de la resistencia a colistina, los aislados de *K. pneumoniae* presentaban resistencia a otros antimicrobianos, destacando los elevados porcentajes de resistencia frente a ampicilina (96%), tetraciclina (89%), sulfametoxazol (78%), trimetoprim (70%), ciprofloxacino (67%) y cloranfenicol (59%). La resistencia observada frente al resto de antimicrobianos incluidos en el panel de sensibilidad fue inferior al 35% (tabla 11).

Se observaron un total de 24 perfiles de resistencia distintos, todos ellos multirresistentes. Cuatro aislados presentaron resistencia a antimicrobianos de ocho grupos distintos, uno de ellos incluyendo hasta 11 antimicrobianos (COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-FOT-TAZ-TCG). En cuanto a la resistencia a colistina, un 70% (19/27) de aislados presentaron valores de CMI de 16

mg/L o superiores (9/27 y 10/27, respectivamente), mientras que los porcentajes de valores de CMI de 4 y 8 mg/L fueron de 19% (5/27) y 11% (3/27), respectivamente

Tabla 11. Distribución de los valores de CMI frente a los 14 antimicrobianos incluidos en la prueba de sensibilidad de los 27 aislados de *K. pneumoniae* procedentes de las muestras de ganado porcino.

	CMI (µg/ml)																	
ATB	≤0,015	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
COL									2	4									
% R = 100										5	3	9	10						
NAL												16	32						
% R = 34									10		5					12			
AMP											8	16							
% R = 88								1					1	6	19				
AZI												16	32						
% R = 10									1		6	10	6	1	3				
FOT						0,25	0,5												
% R = 6					23		1		1		2								
TAZ							0,5	1											
% R = 6						22		1	2	1		1							
CIP				0,06	0,12														
% R = 67	1		4	4		2	2	2	2	1	1	8							
CHL												16	32						
% R = 68										11			1	1	1	13			

	CMI (µg/ml)																		
ATB	≤0,015	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
GEN									2	4									
% R = 33						18			1	1	1	3	2	1					
MER					0,12	0,25													
% R = 0		27																	
SMX														64	128				
% R = 81												1	4	1					21
TET											8	16							
% R = 81								1	1	1		1	1	1	21				
TGC								1	2										
% R = 0					5		15	6		1									
TMP									2	4									
% R = 78							3	3	2					19					

Las áreas en blanco indican el rango de diluciones empleado en cada antimicrobiano. Los valores por encima y por debajo del rango indican el número de aislados cuya CMI es superior a la última o inferior a la primera concentración del rango correspondiente, respectivamente. Las barras verticales indican el punto de corte aplicado para calcular los porcentajes de resistencia (% R), determinado por los valores presentes en la zona azul (en rojo, valor de CMI a partir del cual se considera que un aislado presenta resistencia frente a un determinado antimicrobiano).

Por otro lado, fue destacable la presencia de dos aislados de *A. hydrophila* que presentaron resistencia a 12 de los 14 antimicrobianos incluidos en el panel, incluyendo a meropenem. Los perfiles observados fueron COL-AMP-TET-SMX-TMP-CIP-NAL-GEN-AZI-FOT-TGC-MERO y COL-AMP-TET-SMX-TMP-CHL-CIP-NAL-GEN-AZI-TGC-MERO, respectivamente. Estos fueron los únicos aislados que presentaron un perfil fenotípico compatible con la producción de carbapenemasas, que se confirmó posteriormente con la detección de genes codificantes de carbapenemasas mediante secuenciación completa del genoma (apartado 4.1.2.6).

4.1.2.3. Detección de genes de resistencia a colistina de la familia *mcr* en enterobacterias resistentes a colistina

El 88,4% (490/554) de los aislados ACRB portaban el gen *mcr-1*, seguido de *mcr-4* presente en el 1,8% (10/554) y *mcr-2* en el 0,4 % (2/555) de los aislados COLR. Un aislado de *E. coli* presentaba de forma conjunta los genes *mcr-1* y *mcr-4* (0,2%). El 9,2% restante (51/554) fueron aislados ACRB resistentes a colistina que no presentaron ninguno de los genes *mcr* estudiados (*mcr-1* a *mcr-5* incluidos en la PCR) (tabla 12).

Tabla 12. Especies bacterianas de los aislados ACRB resistentes a colistina (N = 554) obtenidos a partir de muestras de contenido cecal de ganado porcino y detección de genes de la familia *mcr*.

Especie	Nº total aislados	*mcr-1*	*mcr-2*	*mcr-4*	*mcr-1/ mcr-4*	no *mcr*
E. coli	475	462	2	3	1	7
K. pneumoniae	27	12	-	1	-	14
R. ornithinolytica	12	-	-	1	-	11
C. freundii	9	5	-	3	-	1
C. amalonaticus	1	1	-	-	-	-
C. braaki	1	-	-	-	-	1
C. youngae	2	-	-	2	-	-
E. fergusonii	9	9	-	-	-	-
E. cloacae	5	-	-	-	-	5
E. asburiae	5	-	-	-	-	5
A. hydrophila	3	-	-	-	-	3
K. oxytoca	3	-	-	-	-	3
P. aerogenes	1	-	-	-	-	1
S. enterica	1	1	-	-	-	
Nº total ACRB	**554**	**490**	**2**	**10**	**1**	**51**

Dado que la especie más abundante obtenida a partir del muestreo de ganado porcino fue *E. coli* y, teniendo en cuenta que esta especie juega un papel importante en la dispersión de los genes de resistencia de la familia *mcr*, fundamentalmente el gen *mcr-1*, los siguientes análisis se centraron en esta especie bacteriana

4.1.2.4. Relación entre valor de CMI frente a colistina y presencia/ausencia de genes *mcr* en aislados de *E. coli*

Teniendo en cuenta los datos fenotípicos del apartado 4.1.2.2, se observó que el 99,4% (472/475) de los 475 aislados de *E. coli* portadores de genes *mcr* presentaban valores de CMI entre 4 mg/L (266/475; 56,0%) y 8 mg/L (206/475; 43,4%), independientemente de la variante del gen identificada (tabla 13).

Tabla 13. Distribución de los valores de CMI frente a colistina de los aislados de *E. coli* con CMI ≥ 2 mg/L en función de la presencia o ausencia de genes de resistencia de la familia *mcr.*

	Valores de CMI frente a colistina (mg/L)				
Genes *mcr*	**2**	**4**	**8**	**16**	**Total**
mcr-1	2*	262	198	1	463
mcr-2	-	-	2	-	2
mcr-4	-	1	2	-	3
mcr-1/mcr-4	-	-	1	-	1
no *mcr*	-	3	3	-	6
Total	2	266	206	1	475

* Estos aislados fueron considerados resistentes a colistina debido a que ambos albergaban el gen *mcr-1* (confirmado por PCR)

En el caso de *K. pneumoniae*, los valores de CMI frente a colistina más frecuentes fueron de 16 mg/L y superiores a 16 mg/L (nueve y 10 aislados, respectivamente), abarcando el 70% del total (19/27). El 30% restante correspondía a valores de CMI de 4 mg/L (cinco aislados) y 8 mg/L (tres aislados). En cuanto a la presencia de genes *mcr,* 12 aislados albergaban *mcr-1* y uno *mcr-4*. Todos los aislados con estos genes de resistencia presentaban valores de CMI de 4 u 8 mg/L, excepto cinco que mostraban un valor de CMI de 16 mg/L y uno cuyo valor era mayor de 16 mg/L. Por último, 14 aislados (52%) no mostraron presencia de genes *mcr*, de los cuales 12 presentaron valores de CMI de 16 mg/L o superior (cuatro y ocho aislados respectivamente) y dos de 4 mg/L (tabla 14).

Tabla 14. Distribución de los valores de CMI frente a colistina de los aislados de *K. pneumoniae* en función de la detección de genes de la familia *mcr.*

	Valores de CMI frente a colistina (mg/L)				
Genes *mcr*	**4**	**8**	**16**	**>16**	**Total**
mcr-1	3	3	5	1	12
mcr-4	-	-	-	1	1
no *mcr*	2	-	4	8	14
Total	5	3	9	10	27

En cuanto a los 51 aislados restantes que engloban las demás de especies identificadas en el cepario COLR, los valores más frecuentes de CMI fueron 8 mg/L y superiores a 16 mg/L (22 y 15 aislados respectivamente) (tabla 15). Los valores de CMI de 2, 4 y 16 mg/L se obtuvieron en uno, nueve y cuatro aislados, respectivamente (tabla 15). Además, de estos 51 aislados, 21 albergaban genes *mcr* (17 *mcr-1*, cuatro *mcr-4*), mientras que en 30 no se detectaron los genes de la familia analizados (*mcr-1* a *-5*). *C. freundii* fue la especie más heterogénea en cuanto a resultados de CMI y detección de genes *mcr*, ya que los aislados de esta especie presentaban genes *mcr* independientemente del valor de CMI. En cambio, *E. fergusonii* parecía presentar mayor homogeneidad, dado que todos los aislados de esta especie presentaron el gen *mcr-1*, así como *R. ornithinolitica*, cuyos aislados carecían de genes *mcr*, a excepción de uno portador del gen *mcr-4*, o *A. hydrophila*, que no presentó ningún aislado portador de genes *mcr.* Por último, ninguno de los 15 aislados con valores de CMI superiores a 16 mg/L albergaban genes *mcr*, destacando el caso del género *Enterobacter* spp (cinco *E. asburiae* y cinco *E. cloacae*) (tabla 15).

Tabla 15. Distribución de los valores de CMI frente a colistina del resto de especies bacterianas en función de la detección de genes de la familia *mcr.*

CMI (mg/L)	Genes *mcr*	Especies bacterianas												Total *mcr/no mcr*	Total CMI
		R. ornithinolytica	*C. freundii*	*C. braakii*	*C. amalonaticus*	*C. youngae*	*E. fergusonii*	*E. asburiae*	*E. cloacae*	*A. hydrophila*	*K. oxytoca*	*S. enterica*	*P. aerogenes*		
2	*mcr-1*	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	**1**
	mcr-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	no *mcr*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	*mcr-1*	-	2	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	8	**9**
	mcr-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	no *mcr*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
8	*mcr-1*	-	2	-	1	-	3	-	-	-	-	1	-	7	**22**
	mcr-4	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3	
	no *mcr*	7	1	1	-	-	-	-	-	-	2	-	1	12	
16	*mcr-1*	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	**4**
	mcr-4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	no *mcr*	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	
> 16	*mcr-1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	**15**
	mcr-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	no *mcr*	2	-	-	-	-	-	5	5	3	-	-	-	15	
Total		12	9	1	1	1	9	5	5	3	3	1	1		**51**

4.1.2.5. Detección de genes codificantes de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en enterobacterias resistentes a colistina

De acuerdo con los valores de CMI obtenidos frente a FOT y/o TAZ, 31 de 554 aislados ACRB eran posibles productores de BLEEs (24 *E. coli*, cinco *K. pneumoniae* y dos *E. cloacae*) de acuerdo con las directrices marcadas por EUCAST (157), suponiendo un 5,6% (31/554).

En el caso de *E. coli* se detectaron, mediante PCR convencional y posterior confirmación de la variante por secuenciación completa del genoma, 18 aislados portadores de genes $bla_{CTX\text{-}M}$, de los cuales nueve también presentaban el gen $bla_{TEM\text{-}1B}$, dos $bla_{TEM\text{-}1A}$ y uno $bla_{OXA\text{-}10}$. Además, dos aislados de esta especie portaban genes $bla_{SHV\text{-}12}$. De los tres aislados restantes productores de

BLEEs, dos presentaban *bla*$_{CTX-M}$ y uno *bla*$_{SHV}$, pero no se pudo concretar la variedad exacta al no haberse completado el análisis mediante el uso de secuenciación.

En el caso de *K. pneumoniae*, un aislado portaba *bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{SHV-106}$ y *bla*$_{TEM-1A}$ de forma conjunta, otro *bla*$_{CTX-M-9}$, *bla*$_{SHV-187}$ y *bla*$_{TEM-1A}$, también de forma conjunta; otro *bla*$_{SHV-106}$ y un tercero *bla*$_{SHV-145}$ y *bla*$_{TEM-1B}$. Por último, el quinto aislado presentaba fenotipo presuntivo de BLEE y presencia de *bla*$_{SHV}$ detectada por PCR, pero tampoco se pudo concretar la variante al no haber completado el análisis mediante secuenciación.

Por último, los dos aislados de *E. cloacae* albergaron genes *ampC*, cuyos genotipos, confirmados por secuenciación, fueron *bla*$_{ACT-2}$ en uno de ellos y *bla*$_{MIR-3}$ en el otro.

4.1.2.6. Detección de genes codificantes de carbapenemasas en enterobacterias resistentes a colistina

De acuerdo con los valores de CMI frente a meropenem, se observaron dos aislados de *A. hydrophila* posibles productores de carbapenemasas en los muestreos de ganado porcino. Mediante secuenciación se detectó en ambos el gen *imiH* (también conocido como betalactamasa *CphA*), codificante de una enzima clasificada como metalobetalactamasa (MLB) de clase B.

De forma excepcional, se llevó a cabo la caracterización molecular de un aislado de tipo NCRB resistente a colistina (con una CMI superior a 16 mg/L), perteneciente a la especie *E. meningoseptica,* que además presentaba elevada resistencia a carbapenémicos (meropenem MIC = 16 mg/L; imipenem MIC = 16 mg/L; ertapenem MIC > 2 mg/L). Mediante secuenciación completa del genoma no se identificaron genes *mcr* (*mcr-1* a *-10*), pero se detectaron los genes *bla*$_{B-12}$ y *bla*$_{GOB-17,}$ codificantes de metalobetalactamasas, localizados en el cromosoma bacteriano (publicado en: Miguela-Villoldo *et al.,* 2019 [apartado I, anexo VI]).

4.2. Detección y cuantificación directa del gen *mcr-1* en muestras de ganado porcino

4.2.1. Calibración de la técnica de PCR SYBR Green a tiempo real para la cuantificación del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal

Los resultados de la calibración de la técnica de qPCR para cuantificar el gen *mcr-1* mostraron inicialmente los siguientes valores: E = 113,4%, r^2 = 0,975 y pendiente = 3,03. Mientras que las diluciones desde la 0 (10^6 fg ADN/µL) a la -5 (10^1 fg ADN/µL) amplificaron cada una de sus réplicas de acuerdo con lo esperado. Las diluciones -6 (10^0 fg ADN/µL) y -7 (10^{-1} fg ADN/µL) no ofrecían resultados consistentes, por lo que se procedió a excluirlas al establecer la recta de estándares, consiguiendo así optimizar la eficiencia del ensayo (E = 97,7%; r^2 = 0,998; pendiente=3,379). Sin embargo, en un segundo ensayo se comprobó la inconsistencia de los resultados en la dilución -5, la cual mostraba resultado negativo en dos de las tres réplicas, por lo que se decidió eliminarla también de la recta para asegurar su reproducibilidad, obteniendo unos valores de eficiencia de PCR similares (E = 95,3%; r^2 = 0,994; pendiente = 3,441). Por tanto, la recta de estándares se construyó finalmente incluyendo los valores de cinco diluciones (estándares 1, 2, 3, 4 y 5 que se correspondían con las diluciones 0, -1, -2, -3 y -4 respectivamente). Asimismo, se fijó un límite inferior de cuantificación de 10^2 fg/µL (correspondiente a la dilución -4).

4.2.1.1. Ensayo de contaminación artificial de heces de ganado porcino con una cepa de *E. coli* portadora del gen *mcr-1*

Los resultados obtenidos en el ensayo de contaminación artificial de muestras de heces libres de *mcr-1* con una cepa de *E. coli* portadora de este gen fueron los siguientes: E = 91,27%, r2 = 0,999 y temperatura de fusión del ADN de 85 ºC para todas las reacciones. Los valores CT de la recta de estándares fueron 18,08 (*sd* = 0,113), 21,77 (*sd* = 0,174), 25,52 (*sd* = 0,135), 29,37 (*sd* = 0,266) y 32,98 (*sd* = 0,532) para cada uno de los estándares, del 1 al 5 respectivamente (siendo *sd* la desviación estándar asociada a cada valor). Los resultados de la cuantificación de *mcr-1* en las tres alícuotas contaminadas con el gen *mcr-1* (A1, A2 y A3) y en el control negativo (A4) fueron los siguientes: $7{,}22\times10^9$ copias/g, $8{,}08\times10^8$ copias/g, $9{,}22\times10^7$ copias/g y < 10^1 copias/g, con una eficiencia relativa del 100,01%, 99,97% y 100,02% para A1, A2, A3 y A4 respectivamente.

4.2.2. Comparación de resultados de la cuantificación del gen *mcr-1* mediante qPCR en muestras frescas y tras su congelación

De las 272 muestras analizadas (tanto en fresco como tras su congelación durante seis meses), el gen *mcr-1* pudo ser cuantificado en 128 muestras frescas (47%) y en 142 muestras congeladas (52%), mostrando unos valores medios de $4{,}12\times10^4$ copias/µL (3,00 Log_{10} copias/µL) y $9{,}88\times10^4$ copias/µL (3,06 Log_{10} copias/µL) por tipo de muestra respectivamente (figura 9). La diferencia observada entre ambas medias no fue estadísticamente significativa (Test-t, $p = 0{,}508$). Asimismo, comparando los dos resultados obtenidos en cada muestra (en fresco *versus* congelada), se observó que 214 muestras tuvieron un resultado de qPCR concordante (106 fueron ambas qPCR positivas y 108 ambas negativas), y 58 mostraron resultados discordantes (22 muestras tuvieron un resultado de qPCR positivo en fresco pero negativo en muestras congeladas, mientras que 36 fueron negativas en fresco y positivas tras el proceso de congelación) (tabla 16). Esta discordancia podría asociarse al límite de cuantificación establecido de 100 fg de ADN amplificado por microlitro. La concordancia se valoró con el índice kappa (κ), cuyo valor fue 0,58, indicando un grado de acuerdo moderado en la detección de *mcr-1* entre ambos tipos de muestra.

Figura 9. Cuantificación del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal frescas y tras su congelación.

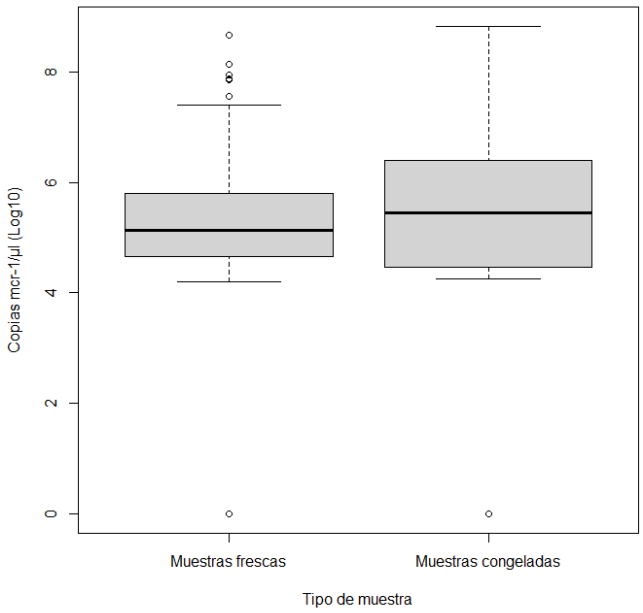


Diagrama de cajas creado con R v 4.1.3 que representa todos los resultados de cuantificación del gen *mcr-1* en 272 muestras frescas y congeladas normalizados como Log_{10}, pudiendo identificarse tanto las medianas como los cuartiles de ambos sets de datos. Los valores atípicos se representan mediante el símbolo "o".

Tabla 16. Comparación de los resultados de detección por qPCR del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal frescas y tras su congelación.

		Muestras frescas (n = 272)	
		+	-
Muestras congeladas (n = 272)	+	106	36
	-	22	108

4.2.3. Detección y cuantificación del gen *mcr-1* en muestras de ganado porcino recogidas en un espacio temporal de 23 años

En este estudio se emplearon 700 muestras de contenido cecal de cerdos sanos, obtenidas en diferentes muestreos llevados a cabo entre los años 1998 y 2021 (tabla 17). Aunque la muestra más antigua analizada procedía de 1998, hasta 2004 no se detectó una muestra en la que se pudiera cuantificar el número de copias del gen *mcr-1* por miligramo de contenido cecal. El porcentaje de muestras positivas fue en aumento desde 2004 (8/50; 16%, IC95%= 7% - 29%) hasta 2010 (22/50; 44%, IC95%= 30% - 59%), mostrando diferencias estadísticamente significativas (p = 0,002) entre ambos años. Desde 2010 hasta 2013, se observó una progresión irregular del porcentaje de muestras en las que se detectaba el gen *mcr-1*, caracterizada por un ligero descenso en el número de muestras positivas al gen, seguido de un aumento significativo en 2015 comparado con los datos de 2010 (p = 0,027). Por tanto, la cantidad de *mcr-1* cuantificado en muestras de contenido cecal de cerdos fue en aumento desde el año 2004 hasta 2015, donde alcanzó su máximo absoluto (33/50; 66%, IC95% = 51% - 79%). Posteriormente, se observó una disminución en el número de copias de *mcr-1* cuantificadas en el periodo comprendido entre 2017 (27/50; 54%, IC95%= 39% - 68%) y 2021 (9/50; 18%, IC95%= 9% - 31%), obteniendo valores significativamente inferiores al pico de 2015 (p< 0,001) y similares a los observados en años anteriores a 2008 (16/50; 32%, IC95%= 20% - 47%) (Tabla 17). Estos resultados han sido publicados (Miguela-Villoldo *et al*., 2019 y Miguela-Villoldo *et al*., 2022 [anexo IV]).

Tabla 17. Resultados de la cuantificación de *mcr-1* mediante qPCR SYBR Green en los muestreos de cerdos destinados a la producción de alimentos en España.

Año	Muestras positivas (%)[1]	IC 95%[2]	Mediana (copias *mcr-1*/mg)
1998	0/50	0,0 – 0,1	*
2002	0/50	0,00 – 0,1	*
2004	8/50 (16)	7 - 29	$5{,}08\times10^{3}$
2006	5/50 (10)	3 - 22	$2{,}92\times10^{3}$
2008	16/50 (32)	20 - 47	$3{,}60\times10^{3}$
2010	22/50 (44)	30 - 59	$1{,}04\times10^{4}$
2011	11/50 (22)	12 - 36	*
2012	16/50 (32)	20 - 47	$5{,}04\times10^{3}$
2013	10/50 (20)	10 - 34	*
2015	33/50 (66)	51 - 79	$6{,}63\times10^{4}$
2017	27/50 (54)	39 - 68	$2{,}65\times10^{4}$
2018	23/50 (46)	32 - 61	$1{,}17\times10^{3}$
2019	14/50 (28)	16 - 43	$4{,}57\times10^{2}$
2021	9/50 (18)	9 - 31	$1{,}67\times10^{2}$
Total	**194/700 (27,7)**	**24,4 - 31,2**	

[1] Se consideró una muestra positiva cuando el valor de cuantificación era igual o superior a $1{,}0\times10^{2}$ fg/µL (equivalente a $1{,}58\times10^{3}$ copias/µL); [2] Intervalo de confianza 95%; *inferior a $1{,}0\times10^{2}$ fg/µL (equivalente a $<1{,}58\times10^{3}$ copias/µL)

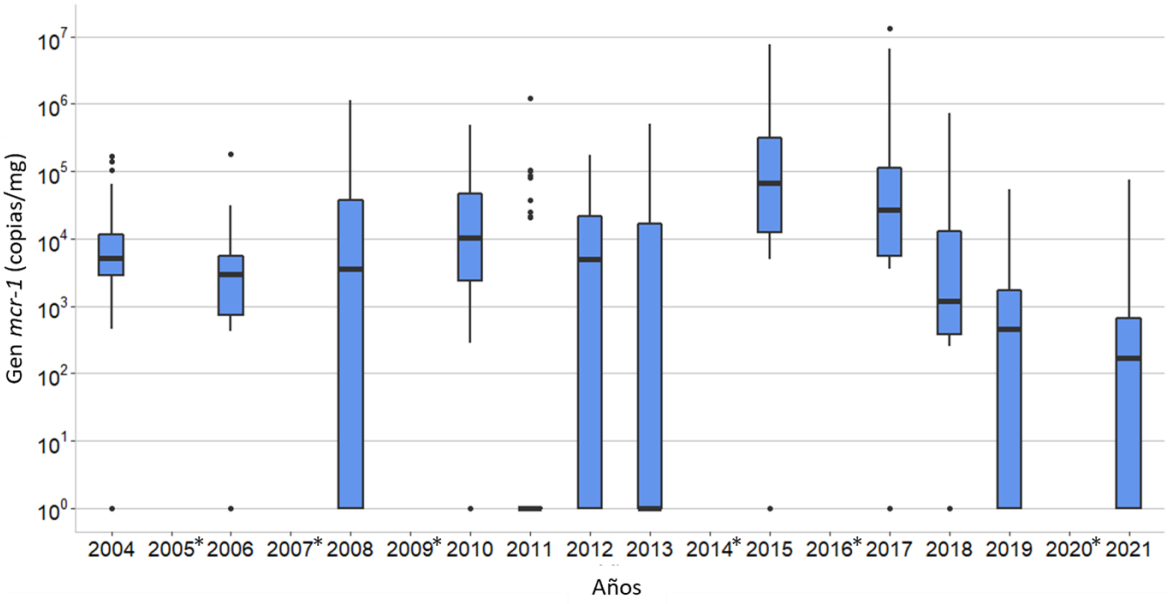
Además, en las muestras con resultado positivo de qPCR se analizó la cantidad de copias del gen *mcr-1* (expresado en copias/mg de contenido cecal) (tabla 18). Los valores de las medianas de los años comprendidos entre 2004 y 2013 ($3{,}09\times10^{4}$ - $6{,}08\times10^{4}$ copias/mg) fueron similares entre sí, observando valores diez veces más elevados en 2008, 2015 y 2017, y diez veces más bajos en 2019 y 2021. Todos los resultados pueden consultarse en el anexo IV. En el año 2015, las medianas de la cuantificación de *mcr-1* muestran un aumento significativo con respecto a 2013 ($p < 0{,}01$). A partir de este año, los resultados mostraron una progresión similar a los porcentajes de muestras positivas anteriormente mencionados. Las medianas de las muestras analizadas de los años 2015 y 2017 mostraron valores similares entre sí (1.52×10^{5} y 1.07×10^{5} copias/mg, respectivamente); sin embargo, la cantidad de *mcr-1* disminuyó significativamente en 2018 respecto a 2017 ($\text{mediana}_{2018} = 1.79\times10^{4}$copias/mg; $p < 0{,}01$). Este descenso continuó observándose en el año 2019 ($\text{mediana}_{2019} = 3.11\times10^{3}$ copias/mg) y se estabilizó en 2021 ($\text{mediana}_{2021} = 4.94\times10^{3}$ copias/mg) (figura 10). Así, ambos indicadores (porcentaje de muestras con presencia de *mcr-1* y mediana de la cantidad de *mcr-1* por muestra) mostraron una progresión similar desde el año 2015.

Tabla 18. Análisis descriptivo anual de la cuantificación del gen *mcr-1* en muestras positivas de cerdos destinados a la producción de alimentos en España.

		Copias/mg muestra			
Año	**N**	**Media**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**
2004	8	$8{,}06\times10^{4}$	$6{,}08\times10^{4}$	$2{,}67\times10^{4}$	$1{,}65\times10^{5}$
2006	5	$8{,}84\times10^{4}$	$3{,}11\times10^{4}$	$2{,}08\times10^{4}$	$1{,}83\times10^{5}$
2008	16	$3{,}07\times10^{5}$	$1{,}80\times10^{5}$	$2{,}55\times10^{4}$	$1{,}12\times10^{6}$
2010	22	$1{,}09\times10^{5}$	$5{,}10\times10^{4}$	$1{,}33\times10^{4}$	$4{,}93\times10^{5}$
2011	11	$1{,}60\times10^{5}$	$3{,}72\times10^{4}$	$2{,}08\times10^{4}$	$1{,}23\times10^{6}$
2012	15	$4{,}74\times10^{4}$	$3{,}09\times10^{4}$	$2{,}06\times10^{4}$	$1{,}77\times10^{5}$
2013	10	$9{,}82\times10^{4}$	$4{,}00\times10^{4}$	$2{,}53\times10^{4}$	$5{,}07\times10^{5}$
2015	33	$9{,}39\times10^{5}$	$1{,}52\times10^{5}$	$2{,}04\times10^{4}$	$7{,}62\times10^{6}$
2017	27	$9{,}62\times10^{5}$	$1{,}07\times10^{5}$	$2{,}24\times10^{4}$	$1{,}32\times10^{7}$
2018	23	$6{,}78\times10^{4}$	$1{,}79\times10^{4}$	$1{,}74\times10^{3}$	$7{,}30\times10^{5}$
2019	14	$9{,}49\times10^{3}$	$3{,}11\times10^{3}$	$1{,}62\times10^{3}$	$5{,}31\times10^{4}$
2021	9	$2{,}45\times10^{4}$	$4{,}94\times10^{3}$	$1{,}81\times10^{3}$	$7{,}60\times10^{4}$

*Las muestras de los años 1998 y 2002 mostraron resultados negativos en cuantificación del gen *mcr-1* por qPCR; N representa el número de muestras positivas sobre un total de 50 por año.

Figura 10. Distribución anual de la abundancia de *mcr-1* en muestras positivas (contenido cecal de cerdos destinados a la producción de alimentos en España).



Los puntos negros de la gráfica (●) representan valores extremos; * Muestras no disponibles en los años 2005, 2007, 2009, 2014, 2016 y 2020.

4.3. Influencia del proceso de congelación de muestras de contenido cecal en las poblaciones bacterianas resistentes a colistina

4.3.1. Variación de la abundancia y diversidad de géneros bacterianos identificados en muestras frescas y tras su congelación

Tras su procesamiento en fresco a su llegada al laboratorio, las 272 muestras de contenido cecal procedentes de ganado porcino recogidas en el año 2018 fueron congeladas durante seis meses y analizadas por segunda vez con el fin de estudiar el efecto del proceso de congelación, tanto en el crecimiento de bacterias resistentes a colistina en medios de cultivo selectivo, como en la detección de ADN bacteriano por qPCR directamente sobre la muestra.

Se observó crecimiento de aislados resistentes a colistina en el 91,0% (247/272) de las muestras frescas y en el 24,6% (67/272) de las muestras congeladas (p < 0,001). De las 272 muestras analizadas, 90 mostraron resultados coincidentes entre los análisis en fresco y tras la congelación (66 muestras con crecimiento de bacterias resistentes a colistina y 24 sin crecimiento, en ambos casos), mientras que 182 presentaron resultados discrepantes (181 muestras con crecimiento bacteriano al ser procesadas en fresco y sin crecimiento tras el periodo de congelación, y una muestra sin crecimiento bacteriano en fresco y con crecimiento tras haber sido congelada) (tabla 19). Estos resultados mostraron un grado de concordancia escaso (κ = 0,05; IC95% = [0,012 – 0,095]).

Tabla 19. Comparación del crecimiento/ausencia de bacterias resistentes a colistina en muestras frescas y tras su congelación (n = 272).

		Muestras frescas	
		+	-
Muestras congeladas	+	66	1
	-	181	24

La frecuencia de crecimiento de cada una de las morfologías observadas en las colonias detectadas en el medio COLR (apartado 3.2.1.1) fue variable, observándose en la mayoría de los casos

crecimiento de dos morfologías (106 muestras), fundamentalmente colonias rosas y blancas. Asimismo, el número de muestras con un solo tipo de morfología detectada fue de 73, de las cuales 55 muestras mostraron crecimiento de colonias rosadas, 13 de colonias blancas y cinco de colonias verdes. Por último, 67 muestras mostraron crecimiento de los tres tipos de morfología y 26 muestras no mostraron crecimiento bacteriano.

En las muestras analizadas en fresco se obtuvieron 486 aislados de diferentes géneros bacterianos, de los cuales, 293 fueron bacterias resistentes a colistina del grupo ACRB y 193 del grupo NCRB. La diversidad de géneros en las muestras frescas mostró un valor de H' = 1,496 (IC95% = 1,393, 1,599) y e = 0,60, indicando que el conjunto de géneros identificados era poco diverso (H'_{max} = 2,39). *Escherichia* spp. fue el género más frecuente en este estudio, obteniendo al menos un aislado de este género en el 50% de las muestras frescas con crecimiento bacteriano resistente a colistina (tabla 20).

En las muestras congeladas se obtuvieron 78 aislados resistentes a colistina, de los cuales 63 fueron bacterias del grupo ACRB y 15 del grupo NCRB. El valor de diversidad observado fue de H' = 1,064 (IC95% = 0,782, 1,34), y una e = 0,51, que al igual que ocurría en el caso de las muestras frescas, indicaba que el conjunto de géneros identificados era poco diverso (H'_{max} = 2,07). En este caso, el género más frecuente también fue *Escherichia* spp., ya que el 72% de las muestras congeladas con crecimiento bacteriano resistente a colistina mostraban al menos un aislado de este género (tabla 20). A pesar de que, tanto las muestras frescas como las congeladas tuvieran índices de diversidad bajos, el valor fue inferior en las muestras analizadas tras el periodo de congelación ya que, teniendo en cuenta los intervalos de confianza al 95% de H', no se observa solapamiento entre ambos grupos (1,393-1,599 y 0,782-1,346, respectivamente).

Comparando el número de aislados ACRB obtenidos en muestras frescas y congeladas (293 y 63 respectivamente), se observó una disminución del 78,5%, mientras que en el grupo NCRB la disminución fue del 92,2% (193 y 15 aislados obtenidos en muestras frescas y congeladas, respectivamente). Por tanto, el proceso de congelación/descongelación disminuyó la cantidad de bacterias resistentes a colistina detectadas en un 84% (desde 486 aislados obtenidos en muestras frescas hasta 78 obtenidos a partir de las muestras tras su congelación). Además, el proceso de congelación/descongelación pareció haber afectado de forma diferente a los géneros ACRB y NCRB, ya que el grupo NCRB experimentó una disminución de bacterias detectadas mayor que la del grupo ACRB.

Tabla 20. Géneros bacterianos detectados en muestras frescas y tras su congelación**.**

	Muestras frescas (n= 272)	Muestras congeladas (n= 272)
	Muestras crecimiento COL-R[1] = 247	Muestras crecimiento COL-R[1] = 67
Género bacteriano	**Aislados (nº)**	**Aislados (nº)**
ACRB	**293**	**63**
Escherichia spp.	248	56
Klebsiella spp.	21	2
Citrobacter spp.	9	1
Raoutella spp.	7	2
Enterobacter spp.	6	2
Aeromonas spp.	2	NA
NCRB	**193**	**15**
Providencia spp.	106	7
Proteus spp.	68	7
Morganella spp.	17	1
Myroides spp.	1	NA
Vibrio spp.	1	NA
Total (ACRB + NCRB)	**486**	**78**

ACRB: géneros bacterianos naturalmente sensibles a colistina; NCRB: géneros bacterianos que son intrínsecamente resistentes a la acción de la colistina; [1] COL-R: resistente a colistina; NA: valores "No Aplicables" correspondientes a los géneros que no fueron detectados en las muestras congeladas.

4.3.2. Detección molecular de genes *mcr* en aislados obtenidos mediante cultivo bacteriano en muestras frescas y congeladas

Como se ha indicado en el apartado anterior, de las 272 muestras de contenido cecal procesadas en fresco se obtuvieron 479 aislados, de los cuales 253 (todos ellos ACRB) fueron portadores de genes *mcr* (1 a 4). El gen *mcr-1* fue identificado en un 51,7% (248/479) de los aislados fenotípicamente resistentes a colistina, el gen *mcr-4* en cuatro, uno de ellos (*E. coli*) en concurrencia con el gen *mcr-1,* y el gen *mcr-2* en otro aislado de *E. coli*. Por otro lado, en 37 aislados no se detectaron genes *mcr*. En ninguno de los 191 aislados NCRB se detectaron genes *mcr*.

En cuanto a las muestras congeladas, de 78 aislados 58 (todos ellos ACRB) fueron portadores de genes *mcr*. El gen *mcr-1* fue detectado en un 73% (57/78) de los aislados, mientras que *mcr-4* fue

identificado en un aislado de *E. coli*, todos ellos pertenecientes al grupo ACRB. Los 20 aislados restantes mostraron resultados de PCR negativos en la detección de genes *mcr* (cinco aislados ACRB y los 15 aislados NCRB) (tabla 21).

Tabla 21. Distribución de genes *mcr* (*mcr-1* a *-5*) por especie bacteriana y tipo de muestra.

	Muestras frescas (N = 486 aislados)						**Muestras congeladas (N = 78 aislados)**					
	mcr-1	***mcr-2***	***mcr-4***	***mcr-1/mcr-4***	**No *mcr***	**Total**	***mcr-1***	***mcr-2***	***mcr-4***	***mcr-1/ mcr-4***	**No *mcr***	**Total**
ACRB												
Escherichia spp.	235	2	1	1	9	**248**	54	0	1	0	1	**56**
Klebsiella spp.	7	0	1	0	13	**21**	2	0	0	0	0	**2**
Citrobacter spp.	5	0	1	0	3	**9**	1	0	0	0	0	**1**
Raoutella spp.	1	0	0	0	6	**7**	0	0	0	0	2	**2**
Enterobacter spp.	0	0	0	0	6	**6**	0	0	0	0	2	**2**
Aeromonas spp.	0	0	0	0	2	**2**	NA	NA	NA	NA	NA	**0**
Total ACRB	**248**	**2**	**3**	**1**	**39**	**293**	**57**	**0**	**1**	**0**	**5**	**63**
NCRB												
Providencia spp.	0	0	0	0	106	**106**	0	0	0	0	7	**7**
Proteus spp.	0	0	0	0	68	**68**	0	0	0	0	7	**7**
Morganella spp.	0	0	0	0	17	**17**	0	0	0	0	1	**1**
Myroides spp.	0	0	0	0	1	**1**	NA	NA	NA	NA	NA	**0**
Vibrio spp.	0	0	0	0	1	**1**	NA	NA	NA	NA	NA	**0**
Total NCRB	**0**	**0**	**0**	**0**	**193**	**193**	**0**	**0**	**0**	**0**	**15**	**15**
Total ACRB+NCRB						**486**						**78**

Todos los aislados obtenidos a partir de ambos tipos de muestra están representados en esta tabla independientemente del número de muestras. NA: valores "No Aplicables" correspondientes a los géneros que no fueron detectados en la muestra.

De los 254 aislados portadores de genes *mcr* obtenidos a partir de muestras frescas, más de la mitad presentaron valores de CMI de 4 mg/L (167/254, 65,7%) y un 31,5%, de 8 mg/L (80/254). Tres aislados (1,2%) presentaron CMI de 2 mg/L, pero fueron considerados como resistentes por albergar el gen de resistencia *mcr-1*. En las muestras congeladas, de 58 aislados portadores de genes *mcr*, 28 (48%) mostraron un valor de CMI frente a la colistina de 4 mg/L y 29 (50%) de 8 mg/L (tabla 22). Por tanto, la mayoría de los aislados portadores de genes *mcr* mostraron valores de CMI frente a colistina superiores a 2 mg/L, siendo 4 y 8 mg/L los valores más frecuentes en este estudio, tanto para aislados de muestras procesadas en fresco como tras su congelación.

Tabla 22. Distribución de aislados portadores de genes *mcr* en función de su CMI frente a la colistina obtenidos tanto en muestras frescas como congeladas.

		CMI (mg/L)							
		≤1	1	2	4	8	16	>16	*Total*
Muestras frescas	*mcr-1*	0	0	3	167	75	2	1	248
	mcr-2	0	0	0	0	2	0	0	2
	mcr-4	0	0	0	0	2	0	1	3
	mcr-1/mcr-4	0	0	0	0	1	0	0	1
	Total	0	0	3	167	80	2	2	**254**
Muestras congeladas	*mcr-1*	0	0	0	28	28	0	1	57
	mcr-2	0	0	0	0	0	0	0	0
	mcr-4	0	0	0	0	1	0	0	1
	mcr-1/mcr-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	28	29	0	1	**58**

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

4.3.3. Comparación de los resultados de detección del gen *mcr-1* mediante cultivo bacteriano + PCR convencional y qPCR en muestras congeladas

Al comparar los resultados obtenidos mediante PCR convencional de los aislados obtenidos mediante cultivo y por qPCR directa en las 272 muestras después de seis meses de congelación, se observaron resultados concordantes en 176 muestras (51 positivas y 125 negativas, ambas) y discrepantes en 96. De estas últimas, 91 muestras fueron positivas a *mcr-1* por qPCR, pero no se recuperaron aislados resistentes a colistina mediante técnicas de cultivo (no se pudo identificar ningún aislado portador de *mcr-1*), mientras que cinco muestras mostraron crecimiento de aislados portadores del gen *mcr-1* en cultivo y, sin embargo, se obtuvo un resultado no cuantificable mediante qPCR (tabla 23). Al igual que ocurría con los resultados expuestos en el apartado 4.2.2, las discordancias observadas podrían asoaciarse al límite de cuantificación establecido (100 fg/µL). Estos resultados mostraron un grado de concordancia débil (κ = 0,31; IC95% = [0,22 - 0,41]).

Tabla 23. Distribución conjunta de los resultados de detección del gen *mcr-1* por métodos basados en cultivo bacteriano, confirmado por PCR convencional, y mediante qPCR SYBR Green en muestras congeladas.

		Cultivo bacteriano + PCR	
		+	-
qPCR SYBR Green (*mcr-1* detectado en muestra)	+	51	91
	-	5	125

4.4. Análisis de la localización genómica de los genes *mcr* y de su entorno genético

En los 123 aislados seleccionados, portadores de al menos un gen *mcr* (apartado 3.2.3.4.2), se identificaron genes de la familia *mcr* en 127 ubicaciones distintas: 101 genes *mcr* en plásmidos y 26 en el cromosoma bacteriano. Cuatro aislados de *E. coli* mostraron presencia conjunta de dos genes *mcr*, aunque en todos cada gen se ubicaba en un plásmido distinto (tabla 24). El resto de aislados presentaron un solo tipo de *mcr*, con independencia de la especie bacteriana.

Tabla 24. Localización conjunta de genes *mcr* en aislados de *E. coli* (n = 4).

Referencia	Localización 1		Localización 2	
	Genes *mcr*	Tipos de plásmido	Genes *mcr*	Tipos de plásmido
ZTA15/00420EB1	*mcr-1.1*	IncX4	*mcr-4.1*	ColE10
ZTA15/01169-1EB1	*mcr-1.1*	IncHI2	*mcr-3.2*	IncY
ZTA17/00762COL1	*mcr-1.1*	IncX4	*mcr-1.1*	IncHI2
ZTA18/01741BL	*mcr-1.1*	IncHI2	*mcr-4.1*	ColE10

Los plásmidos portadores de *mcr* más frecuentes fueron IncX4, IncHI2 y ColE10. IncX4 fue el más frecuente, siendo detectado en el 40,6% de los aislados (50/123), mientras que los de tipo IncHI2 y ColE10 mostraron frecuencias inferiores, siendo detectados en el 21,1% (26/123) y 13,0% (16/123) de los aislados, respectivamente (tabla 25). Además, se identificaron otros plásmidos de tipo IncHI1, IncP, IncX1 e IncY y cuatro plásmidos más cuyo tipo de replicón no pudo ser determinado.

Atendiendo a los distintos genotipos de *mcr*, se pudo observar que *mcr-1* se encontraba asociado a los plásmidos de tipo IncX4 e IncHI2, mientras que *mcr-4* solo se detectó en plásmidos de tipo ColE10. El resto de variantes fueron detectadas en diferentes estructuras plasmídicas: *mcr-2* en un plásmido IncP y en un plásmido no tipificado, *mcr-3* en un plásmido IncY y *mcr-5* en un plásmido IncX1 (tabla 25).

Tabla 25. Distribución de los tipos de plásmidos encontrados en los 123 aislados en función de su potencial transmisibilidad y del tipo de *mcr* que albergaban.

Ubicación genes *mcr*	N	Transmisi-bilidad	Genes de la familia *mcr*				
			mcr-1	***mcr-2***	***mcr-3***	***mcr-4***	***mcr-5***
Plásmido	101						
IncX4	51	c	48	-	-	-	-
		m	1	-	-	-	-
		nm	2	-	-	-	-
IncHI2	26	c	22	-	-	-	-
		m	-	-	-	-	-
		nm	4	-	-	-	-
ColE10	16	c	-	-	-	-	-
		m	-	-	-	16	-
		nm	-	-	-	-	-
IncHI1	1	c	-	1	-	-	-
		m	-	-	-	-	-
		nm	-	-	-	-	-
IncP	1	c	-	-	-	-	-
		m	-	-	-	-	-
		nm	1	-	-	-	-
IncX1	1	c	-	-	-	-	1
		m	-	-	-	-	-
		nm	-	-	-	-	-
IncY	1	c	-	-	-	-	-
		m	-	-	-	-	-
		nm	-	-	1	-	-
No tipificado	4	c	-	-	-	-	-
		m	3	1	-	-	-
		nm	-	-	-	-	-
Cromosoma bacteriano	26		26	-	-	-	-
Total	127		107	2	1	16	1

c: plásmidos conjugativos; m: plásmidos movilizables no autoconjugativos; nm: plásmidos no movilizables

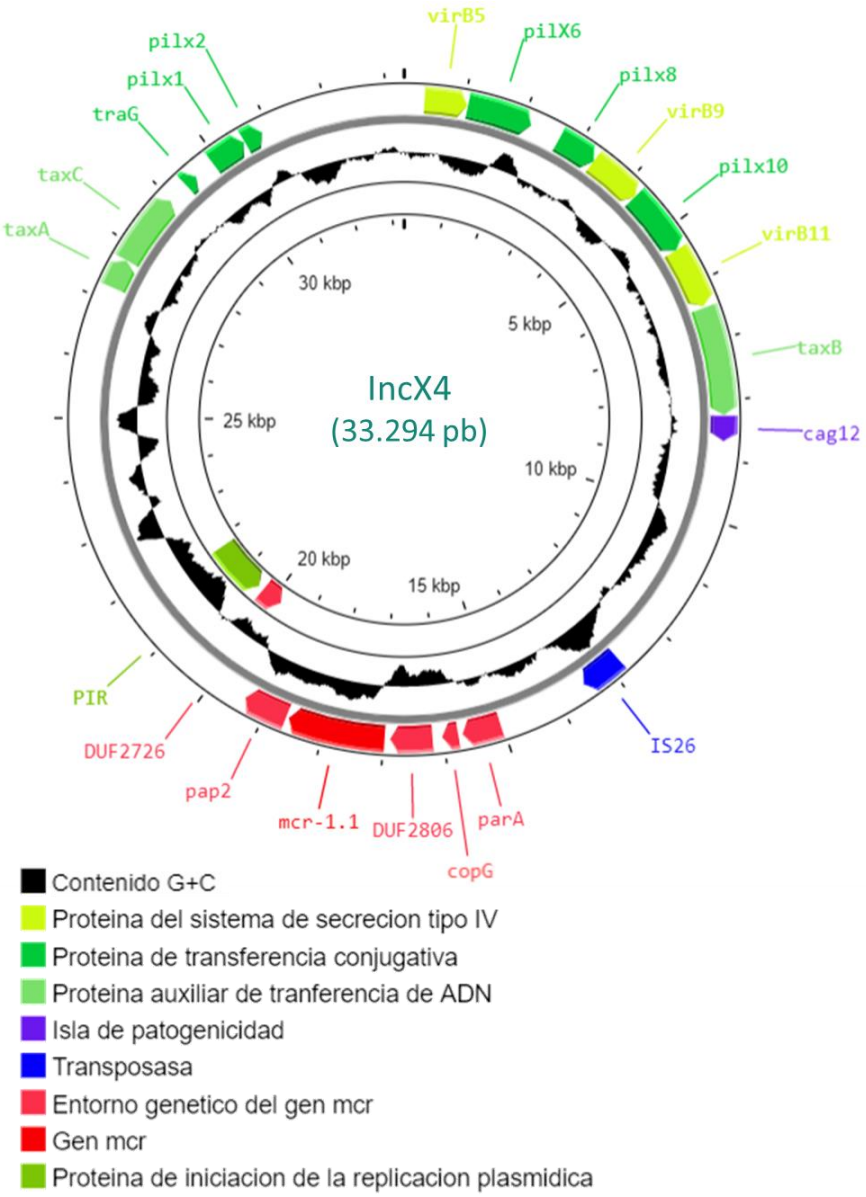
4.4.1. Plásmidos de tipo IncX4

Los plásmidos de tipo IncX4 se detectaron en 51 de los 123 genomas secuenciados (50 *E. coli* y un *C. youngae*), presentando un tamaño medio de 35 kb. De ellos, 48 resultaron ser conjugativos, dos fueron clasificados como no movilizables, debido a que carecían de los elementos MOB y MPF, y uno como movilizable, dado que presentaba relaxasa y solo carecía de MPF.

Los 48 plásmidos conjugativos presentaron los mismos elementos involucrados en su transmisibilidad, contando con el módulo MOB_P, compuesto por una relaxasa, *oriT* y sistema de secreción tipo IV (T4CP), y el complejo MPF_T. Además, también contaban con los genes *virB* y *pilX,* codificantes de proteínas relacionadas con estructuras como el sistema de secreción tipo IV, necesario para llevar a cabo la conjugación por sí mismos. Todos ellos portaban el gen *mcr-1.1*, el cual siempre aparecía con el mismo entorno genético, compuesto del gen *parA*, gen *copG*, dominio DUF2806, gen *mcr-1.1*, gen *pap2* y dominio DUF2726, conservando siempre este orden (figura 11).

En la figura 11 se ejemplifica la distribución de los genes detectados en los plásmidos IncX4 con la reconstrucción del identificado en aislado de *E. coli* ZTA13/01379RS.

Figura 11. Reconstrucción de un plásmido IncX4.



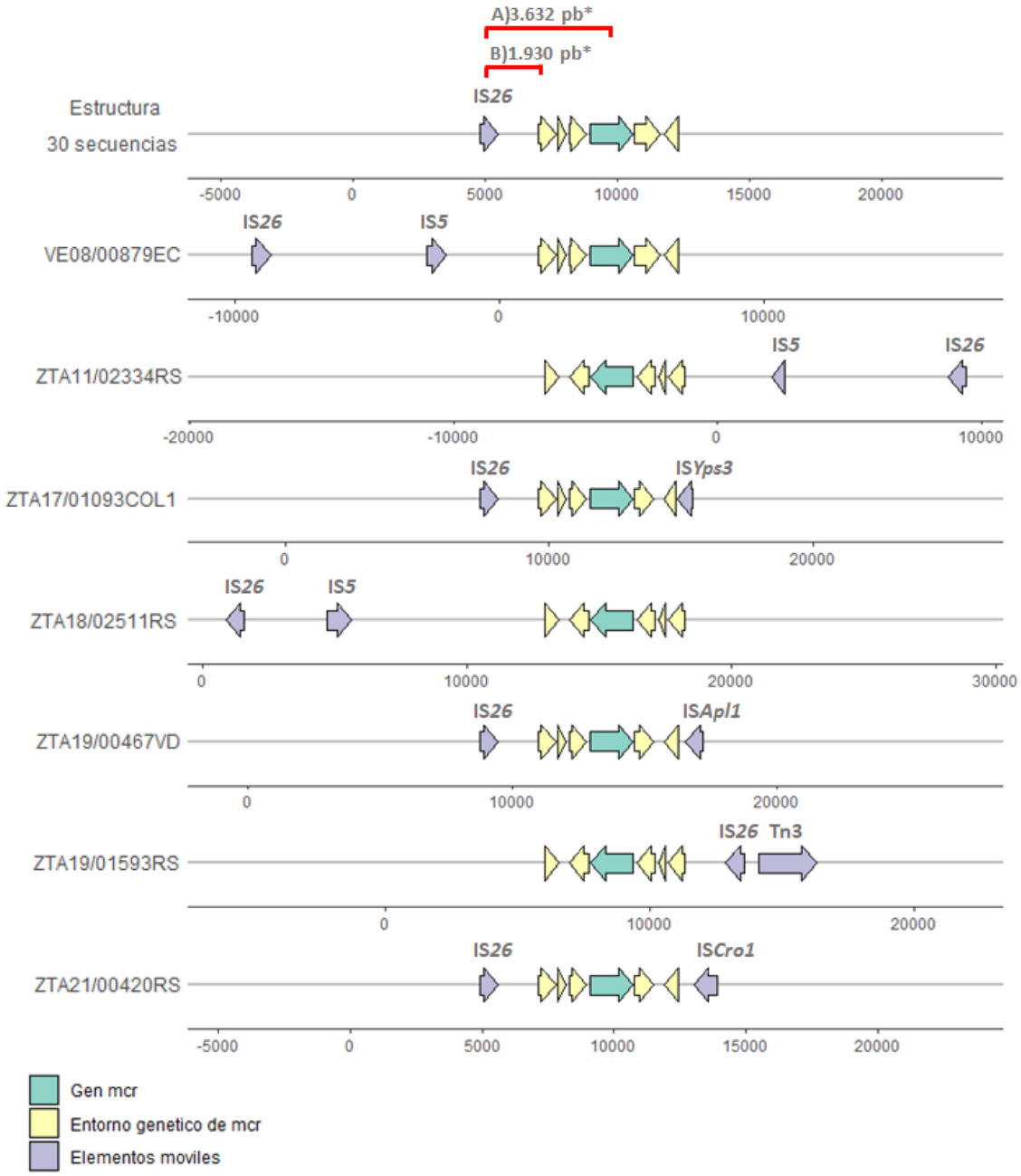
Reconstrucción del plásmido IncX4 del aislado ZTA13/01379RS (*E. coli*) portador de un gen *mcr-1.1*, donde se muestra el entorno genético de este gen y todos aquellos genes que intervienen en la transmisibilidad del plásmido. La escala del círculo interno indica el número de bases del que se compone el plásmido. Las flechas de colores representan los genes que se codifican en esta estructura. En esta reconstrucción se representan genes relacionados con la replicación y la movilidad del plásmido por conjugación, ISs y el gen *mcr* con al entorno genético que le rodea. El color negro indica el contenido en guanina – citosina (GC) del plásmido.

El 85% de los plásmidos IncX4 conjugativos (41/48) presentaba *mcr-1.1* como único gen de resistencia a antimicrobianos, mientras que seis aislados presentaron, además, el gen de resistencia a tetraciclina *tetM* (en todos ellos este gen se encontraba flanqueado por las secuencias de inserción IS*5* e IS*26*) y uno el gen *bla* $_{\text{TEM-12}}$ codificante de BLEEs, situado junto a un transposón de tipo TnpA.

El plásmido IncX4 movilizable, además de *mcr-1.1*, portaba también el gen *floR*, el cual codifica una bomba de eflujo que confiere resistencia a cloranfenicol (158), situado en el transposón Tn*As1* y flanqueado por dos IS*26* (IS*26* – *floR* – Tn*As1* – IS*26*). De los dos plásmidos no transmisibles restantes, uno no contenía genes de resistencia adicionales a *mcr-1* y el otro era portador de los genes de resistencia *tetM*, *aadA2*, *lnuF* (responsables de la resistencia a tetraciclinas, aminoglucósidos y lincosamida, respectivamente). Estos genes se situaban en un transposón Tn*552*, y flanqueados por dos IS*26*, con la siguiente configuración: IS*256* – *tetM* – IS*26* – *lnuF* – *aadA2* – IS*26* – Tn*552*.

Además, de los 51 plásmidos IncX4 identificados, 37 albergaron una secuencia de inserción IS*26* en posiciones cercanas a *mcr-1*, incluyendo el plásmido movilizable y los dos plásmidos no movilizables. En nueve de estos casos, además de IS26, se pudieron identificar otras IS localizadas junto al gen *mcr-1*, como IS*5*, IS*Yps3*, IS*Apl1* e IS*Cro1*, y en uno de ellos el transposón Tn*3* (figura 12).

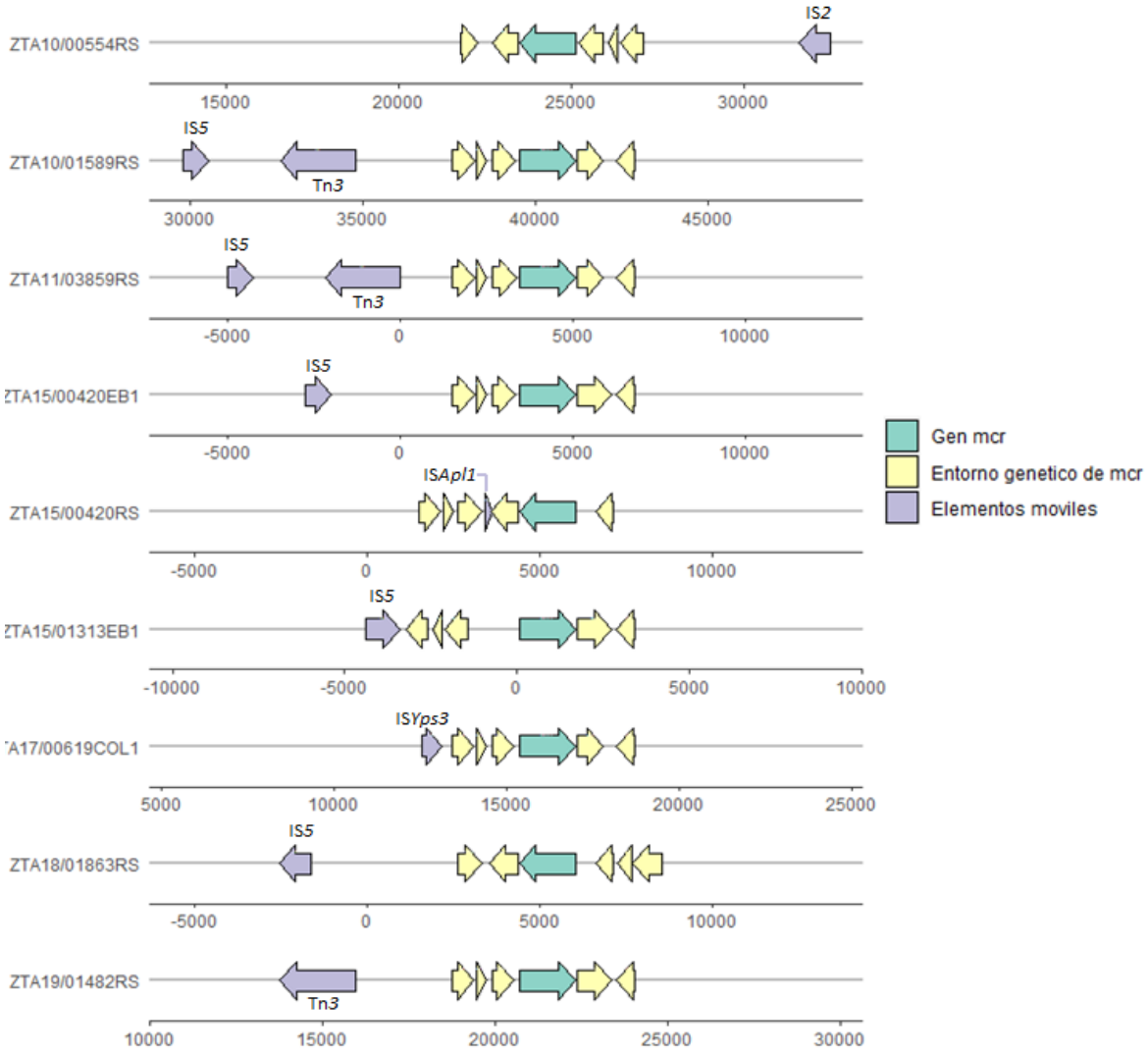
Figura 12. Relación de secuencias de inserción (IS) de tipo IS*26* que flanquean a los genes *mcr* y su entorno genético en plásmidos IncX4.



* Distancia media expresada en pares de bases (pb) de 30 aislados comprendida entre A) IS*26* y el gen *mcr-1.1*; y B) IS*26* y el entorno genético asociado a *mcr-1.1*; las flechas representan genes y la punta indica su orientación en el plásmido. Todas las secuencias de genes están alineadas en función de los genes *mcr.* En la parte inferior de cada una se representa la escala de pares de bases donde se ubica cada elemento.

En cuanto al resto de plásmidos IncX4, nueve presentaron otros tipos de IS en el entorno del gen *mcr-1* diferentes a IS*26*, como IS*2*, IS*5*, IS*Yps3*e IS*Apl1*, y tres de ellos, el transposón Tn*3* (figura 13). IS*Apl1* es la única IS que se localiza intercalada en el entorno genético que circunda al *mcr-1* presentando la secuencia de genes DUF2726 – *mcr-1.1* – *pap2* – IS*Apl1* – DUF2806 – *copG* - *parA* (ZTA15/00420RS, figura 13), mientras que el resto de secuencias de inserción suelen encontrarse antes, después o flanqueando ambos extremos de este conjunto de genes. Por último, cuatro plásmidos no presentaron secuencias de inserción en el entorno del gen *mcr-1*.

Figura 13. Relación de secuencias de inserción diferentes a IS*26* que flanquean a los genes *mcr* y su entorno genético en plásmidos IncX4.



Las flechas representan genes y la punta indica su orientación en el plásmido. Todas las secuencias de genes están alineadas en función de los genes *mcr. E*n la parte inferior de cada una se representa la escala de pares de bases donde se ubica cada elemento.

4.4.2. Plásmidos de tipo IncHI2

Los plásmidos de tipo IncHI2 fueron identificados en 26 de los 123 genomas secuenciados (todos ellos pertenecientes a la especie *E. coli*), y tenían un tamaño medio de 250 kb, siendo la segunda estructura plasmídica más frecuente en el conjunto de aislados secuenciados. De estos 26 plásmidos IncHI2, 21 eran conjugativos, dado que presentaban las estructuras necesarias para realizar el proceso de conjugación de forma autónoma (relaxasa, *oriT* y MPF), uno resultó ser transferible no conjugativo, ya que carecía de relaxasa, y cuatro fueron no transferibles por carecer de relaxasa y *oriT*. Además, en todos ellos se apreciaban agrupaciones de genes que juegan un papel importante en la movilización de los plásmidos mediante conjugación: genes *rep* (*repA*, *repB*, *repHI2*), que intervienen en la iniciación de la replicación del plásmido; genes *tra* (*traB*, *traD*, *traH*, *traI*, *traJ*, *traK*, *traM*, *traY*), que codifican proteínas para la formación del T4CP y del relaxosoma necesarios para llevar a cabo el proceso de conjugación; genes *trh* (*trhA, trhB, trhC, trhE, trhF, trhG, trhH, trhI, trhK, trhL, trhN, trhO, trhR, trhU, trhV, trhW, trhY, trhZ*), que codifican proteínas involucradas en el proceso de conjugación de plásmidos de tipo IncHI; genes *htd* (*htdA*, *htdF*, *htdK*, *htdO*, *htdV*), característicos de plásmidos de tipo IncHI, que participan en la formación del pili; genes *par* (*parA*, *parB*, *parM*, *parR*),que controlan la fragmentación del plásmido, y, por último, genes *orf* (*orf4*, *orf16*, *orf17*, *orf19*), que intervienen en la replicación del plásmido.

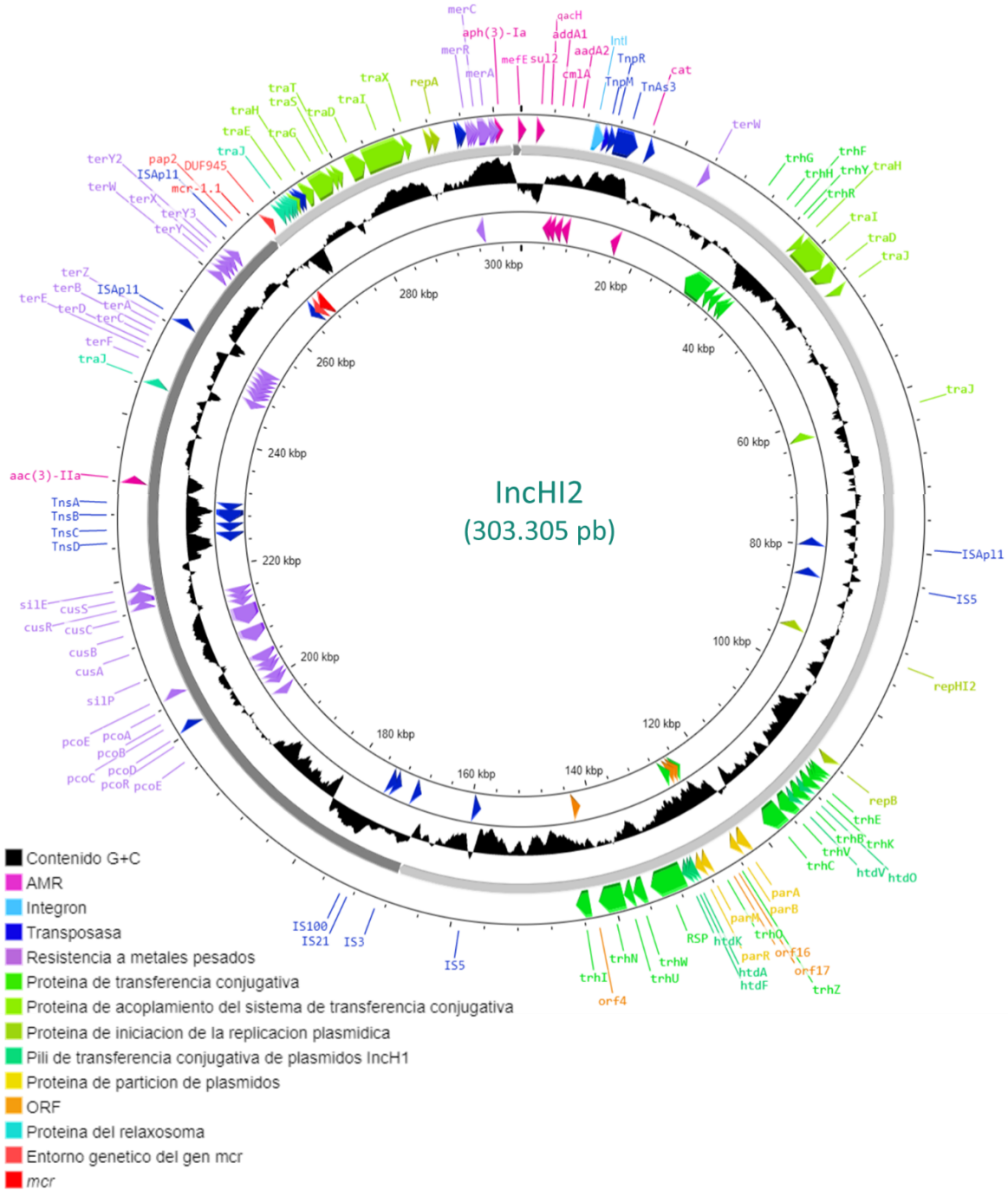
Los 26 plásmidos IncHI2 albergaban el gen *mcr-1.1* (uno de ellos la variante *mcr-1.2*) y otros genes de resistencia a antimicrobianos, entre los que, en ningún caso, se intercalaron genes de la familia *mcr*. Los genes de resistencia a antimicrobianos más frecuentemente identificados fueron *aac(3)-Iia* (22/27) (resistencia a aminoglucósidos), *tet* (16/26), *aadA* (15/26), *strA/B* (13/26) (resistencia a aminoglucósidos), bla_{TEM} (11/26), *mefE* (10/26) (resistencia a macrólidos), *sul* (10/26) (resistencia a sulfonamidas) y *cmlA* (10/26) (resistencia a cloranfenicol). El resto de genes de resistencia a antimicrobianos (*aph(4)-Ia*, *cat*, *floR*, *aph(3')-Ia*, *qnrS*) fueron identificados de forma esporádica, presentando frecuencias inferiores al 30%. En nueve plasmidos IncHI2 se encontró un integrón de tipo 1 con la siguiente composición: IntI – *aadA2* – *cmlA* – *aadA1* – *qacH* – *sul2* – *mefE* (figura 14).

Otra característica común a todos los plásmidos IncHI2 (excepto en un aislado) fue la presencia de genes de resistencia a metales pesados (*ter*, *mer*, *pco*, *sil* y *cus*). Estos genes normalmente estaban localizados en regiones próximas unos de otros y con presencia de IS*Apl1* en sus proximidades o

de un transposón tipo Tn*3*. Los genes *ter* (resistencia a telurio) fueron los más frecuentes, ya que estaban presentes en 25 plásmidos de los 26 identificados como tipo IncHI2. Otros genes de resistencia a metales pesados detectados fueron *mer* (resistencia a mercurio) en 12 plásmidos; *pco* (resistencia a cobre) en 10 plásmidos; *sil* (resistencia a plata) en nueve plásmidos y *cus* (resistencia a cobre y plata) en nueve plásmidos. Con frecuencia estos plásmidos presentaron mas de dos de estos genes de resistencia (18/26 plásmidos), mientras que ocho albergaban sólo uno (siete a telurio y uno a mercurio).

En la figura 14 se representa, a modo de ejemplo, la distribución de los genes identificados en el plásmido IncHI2 del aislado de *E. coli* VE06/00683EC.

Figura 14. Reconstrucción del plásmido IncHI2.



Reconstrucción del plásmido IncHI2 del aislado VE06/00683EC (*E. coli*) portador de un gen *mcr-1.1*. En esta reconstrucción se representan: genes relacionados con la replicación y la movilidad del plásmido por conjugación; genes característicos de los plásmidos IncH que intervienen en la conjugación; secuencias de inserción; genes de resistencia a antimicrobianos (AMR), así como, el gen *mcr* junto al entorno genético que le rodea y genes de resistencia a metales pesados. El color negro indica el contenido en guanina – citosina (GC) del plásmido. La escala del círculo interno indica el número de bases del que se compone el plásmido. Las flechas de colores representan los genes presentes en esta estructura.

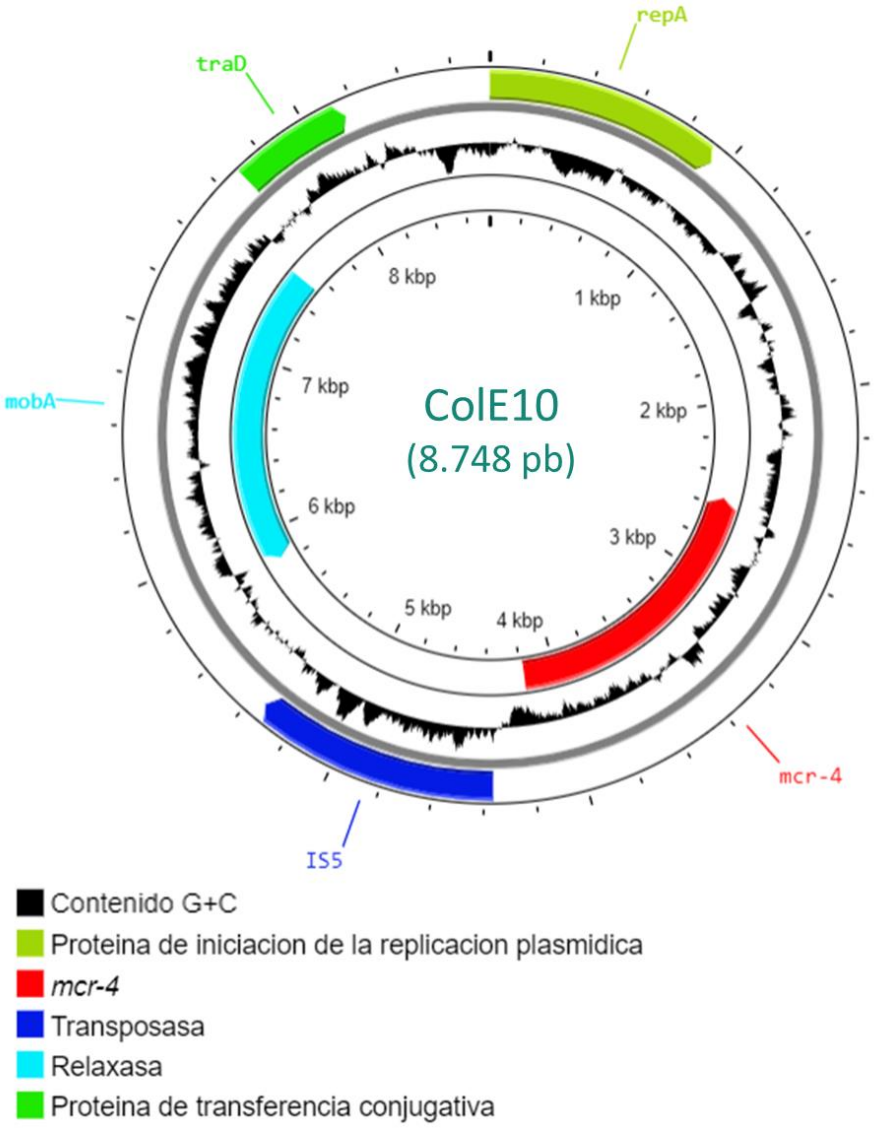
4.4.3. Plásmidos de tipo ColE10

Se identificaron 16 plásmidos de tipo ColE10 en aislados de diferentes especies bacterianas: 10 en *E. coli*, dos en *E. fergusonii*, dos en *R. ornithinolytica*, uno en *C. freundii* y uno en *K. pneumoniae*. Este tipo de plásmido presentaba un tamaño medio de 9 kb, siendo la estructura plasmídica de menor tamaño identificada. Los 16 plásmidos ColE10 resultaron ser movilizables, ya que presentaban relaxasa pero carecían de *oriT* y MPF. Además del gen *mobA* (relaxasa), se detectaron los genes *repA*, que interviene en la replicación del plásmido, y *traD*, que codifican proteínas que intervienen en el proceso de conjugación.

Estos plásmidos solo albergaban genes de resistencia a colistina de tipo *mcr-4* (cinco *mcr-4.1*, tres *mcr-4.2* y ocho *mcr-4.3*), siendo este genotipo identificado únicamente en plásmidos de tipo ColE10. En 10 plásmidos se detectaron secuencias de inserción en las proximidades de los genes *mcr-4*: IS*5* en seis plásmidos; IS*4* en dos plásmidos, uno de ellos junto a la variante IS*26*; IS*26* e IS*110*, detectadas en un mismo plásmido, e IS*4*, IS*26* e IS*110*, identificadas también en un mismo plásmido. Por último, seis plásmidos carecían de IS en el entorno del gen *mcr-4*.

En la figura 15 se representa la estructura del plásmido ColE10 identificada en el aislado de *E. coli* ZTA13/01100EC a modo de ejemplo.

Figura 15. Reconstrucción del plásmido ColE10.



Reconstrucción del plásmido ColE10 del aislado ZTA13/01100EC (*E. coli*) portador de un gen *mcr-4*. La escala del círculo interno indica el número de bases del que se compone el plásmido. Las flechas de colores representan los genes que de esta estructura. En esta reconstrucción se representan genes relacionados con la replicación y la movilidad del plásmido por conjugación, secuencias de inserción y el gen de resistencia a colistina *mcr-4*. El color negro indica el contenido en guanina – citosina (GC) del plásmido.

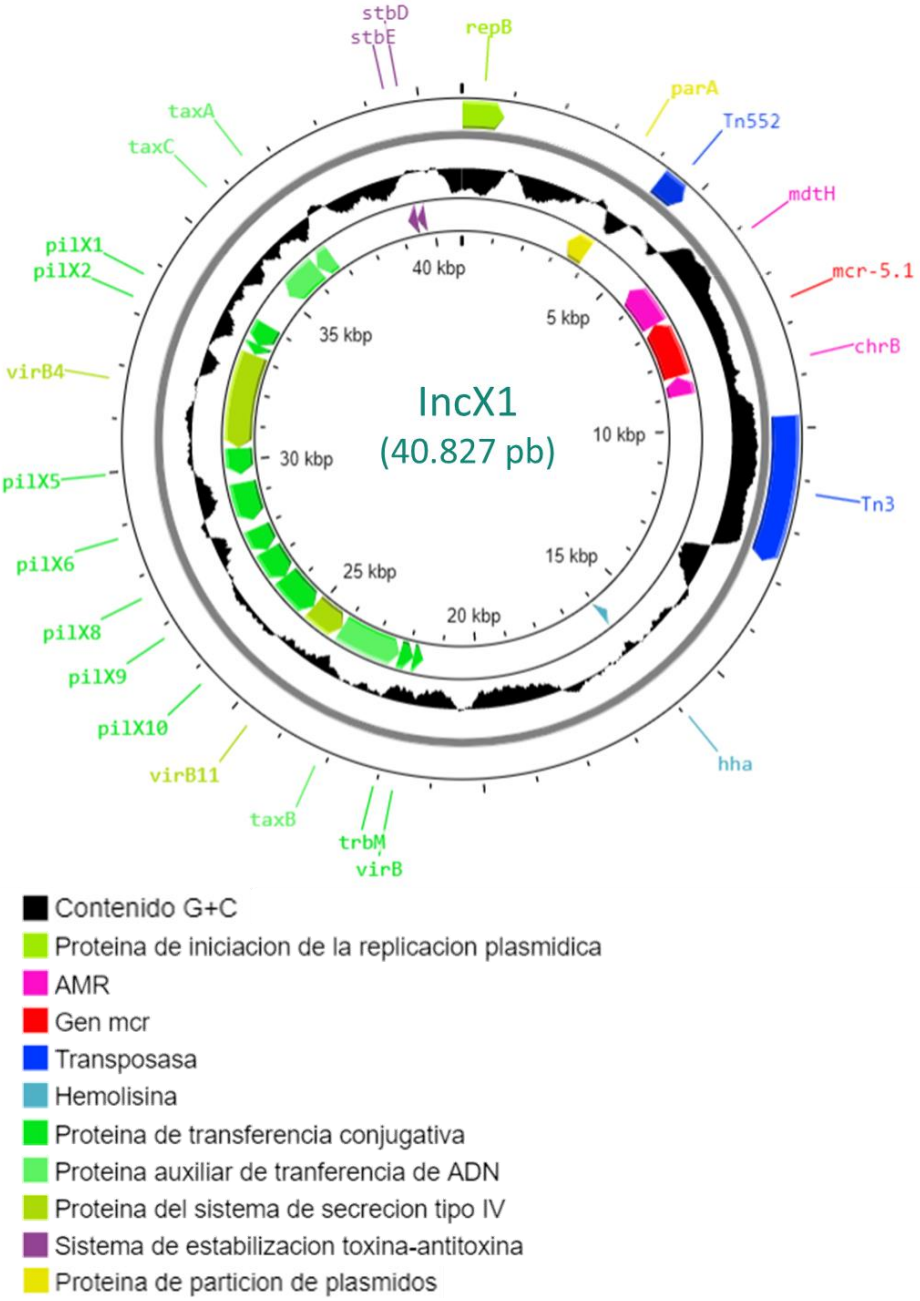
4.4.4. Plásmido de tipo IncX1

Este tipo de plásmido fue detectado en un aislado de *E. coli*, y mostraba una estructura similar a la variante IncX4 anteriormente descrita. Se trataba de un plásmido de 40,8 Kb de tamaño, conjugativo, que presentaba la relaxasa MOB_P, *oriT* y T4CP, y el complejo MPF_T, los mismos que los plásmidos de tipo IncX4.

Este plásmido albergaba el gen *mcr-5.1*, siendo la única descripción de esta variante entre todos los aislados derivados de los muestreos de animales realizados en esta tesis doctoral. En las proximidades de este gen aparecían también los genes *mdtH* (bomba de eflujo de multirresistencia) y *chrB* (resistencia a macrólidos) que, junto a *mcr-5.1*, formaban una región de resistencia compuesta por tres genes flanqueado por dos transposones de tipo Tn*552* y Tn*3* (figura 16).

En la figura 16 se representa la estructura del plásmido IncX1 identificada en el aislado de *E. coli* VE08/02989.

Figura 16. Reconstrucción del plásmido IncX1.



Reconstrucción del plásmido IncX1 del aislado VE08/02989EC (*E. coli*) portador de un gen *mcr-5*. La escala del círculo interno indica el número de bases del que se compone el plásmido. Las flechas de colores representan los genes de esta estructura. En esta reconstrucción se representan genes relacionados con la replicación y la movilidad del plásmido por conjugación, secuencias de inserción y genes de resistencia a antimicrobianos (AMR), así como el gen *mcr-5.1*. El color negro indica el contenido en guanina – citosina (GC) del plásmido.

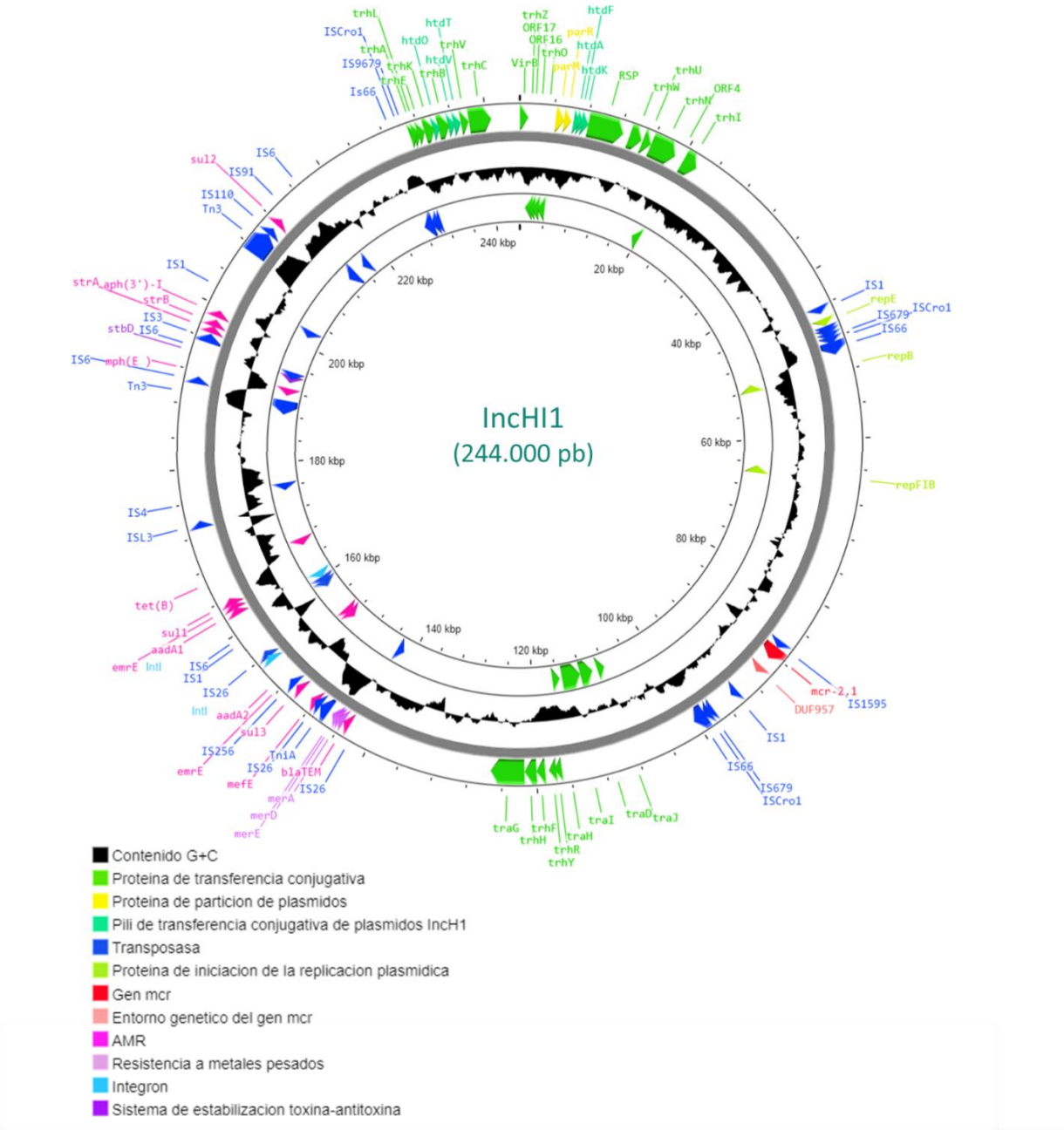
4.4.5. Plásmido de tipo IncHI1

Este plásmido, identificado en un aislado de *E. coli*, mostraba una estructura similar a los de tipo IncHI2, su tamaño era de 244 Kb y presentaba los elementos necesarios para considerarse auto-conjugativo: módulo MOB_H (compuesto por relaxasa, *oriT* y T4CP) y el complejo MPF_F. Además, presentaba genes *rep* (*repB*, *repE*), *tra* (*traD*, *traG*, *traH*, *traI*, *traJ*); *trh* (*trhA, trhB, trhC, trhE, trhF, trhH, trhI, trhK, trhL, trhN, trhO, trhR, trhU, trhV, trhW, trhY, trhZ*); *htd* (*htdA*, *htdF*, *htdK*, *htdO*, *htdV*, *htdT*); *par* (*parM*, *parR*) y *orf* (*orf4*, *orf16*, *orf17*), con idénticas funciones a las descritas en los plásmidos de tipo IncHI2, interviniendo en la movilización del plásmido mediante el proceso de conjugación.

Este plásmido portaba el gen *mcr-2.1* y, junto a él, aparecía el dominio DUF957, al igual que ocurría en los plásmidos de tipo IncHI2; sin embargo, carecía del gen *pap2* que acompañaba al gen *mcr-1*. Además, se identificaron otros 14 genes que conferían resistencia a antimicrobianos. Varios de ellos estaban localizados en dos integrones de tipo I, próximos entre sí, con las siguientes configuraciones: IntI – *aadA1* – *emrE* – *sul1* y *Int1* - *aadA2* – *emrE* - *sul3*. Por delante de estos dos integrones estaba *tetB* y por detrás *mefE* y $bla_{TEM-1.}$ En otra zona cercana del plásmido se encontraban los genes *mphE, strA* y *strB, aph(3')-I* y *sul2.* Estos genes de resistencia se localizaban a lo largo de una región de 30 kb, flanqueados por múltiples ISs (figura 17). Además, este plásmido albergaba genes de resistencia a mercurio (*merA*, *merD* y *merE*).

En la figura 17 se representa la estructura del plásmido IncHI1 identificada en el aislado *E. coli* ZTA19/01126RS.

Figura 17. Reconstrucción del plásmido IncHI1.



Reconstrucción del plásmido IncHI1 del aislado ZTA19/01126RS (*E. coli*) portador de un gen *mcr*-2. La escala del círculo interno indica el número de bases del que se compone el plásmido. Las flechas de colores representan los genes de esta estructura. En esta reconstrucción se representan genes relacionados con la replicación y la movilidad del plásmido por conjugación, genes característicos de los plásmidos IncH que intervienen en la conjugación, secuencias de inserción, genes de resistencia a antimicrobianos (AMR), así como el gen *mcr-2.1*, junto al entorno genético que le rodea y genes de resistencia a metales pesados. El color negro indica el contenido en guanina – citosina (GC) del plásmido.

4.4.6. Otros plásmidos

Además de los ya descritos, se detectaron plásmidos de tipos IncP (n=1) e IncY (n=1), más cuatro plásmidos cuyo tipo de incompatibilidad no se pudo determinar. IncP carecía de relaxasa, *oriT* y MPF, al igual que IncY, aunque este último contaba con un gen *virB* que codificaba proteínas para la formación del T4CP necesario para llevar a cabo la conjugación. No obstante, dado que no se detectaron el resto de los genes pertenecientes a la agrupación de genes *virB*, se clasificó junto al IncP, como plásmido no transferible.

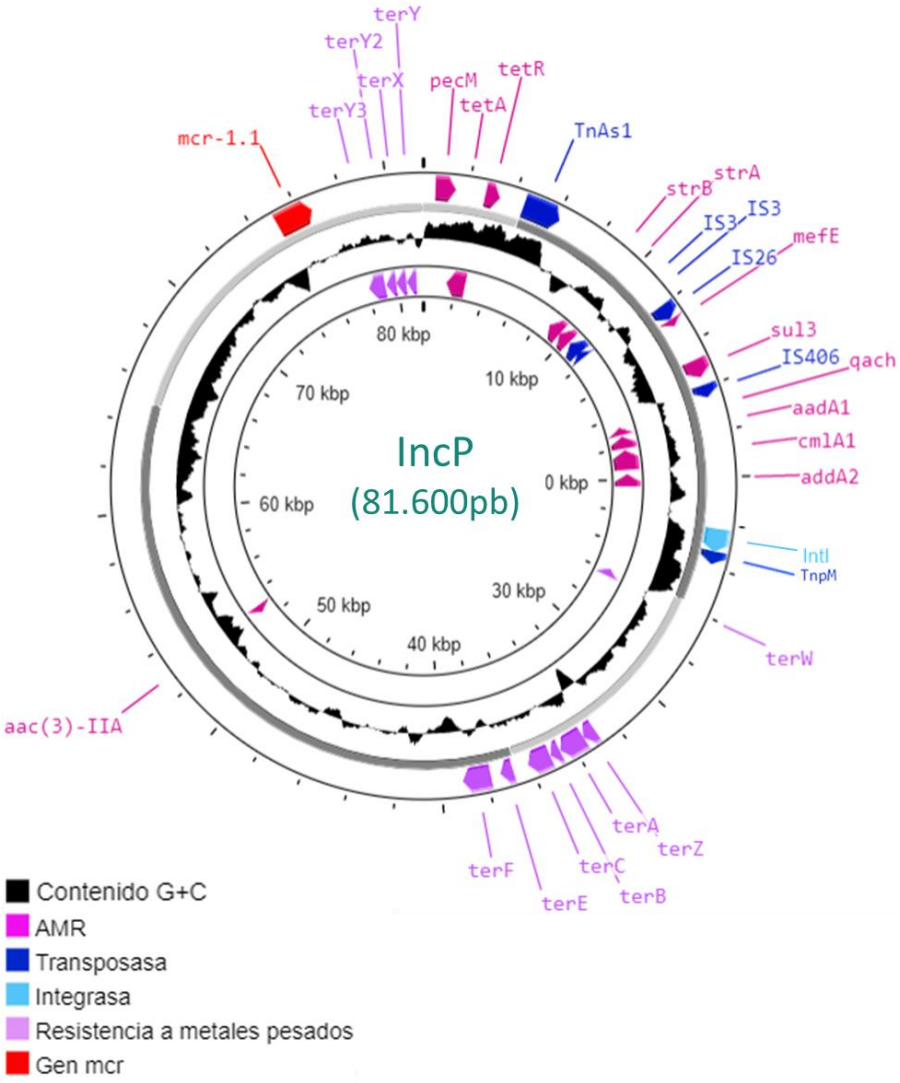
Estas estructuras se caracterizaban por albergar un amplio número de genes de resistencia a antimicrobianos, flanqueados normalmente por ISs. Ambos plásmidos eran portadores de genes *mcr*, identificándose *mcr-1.1* en IncP y *mcr-3.2* en el plásmido IncY.

Además, IncP albergaba un integron de tipo I con la siguiente configuración: I*nt1* - *aadA2* – *cmlA* - *aadA1* – *qacH* - *sul3.* Otros genes de resistencia a antimicrobianos detectados en el plásmido han sido *aac(3)-IIA*, *strA*, *strB*, *mefE* y *tetA* . Estos genes se encontraban próximos entre sí a excepción de los genes *aac(3)-IIa* y *mcr-1.1*.

Este plásmido presentaba también genes de resistencia al telurio (genes *ter)*, los cuales se localizaban en dos agrupaciones de genes situados de forma distante en la estructura del plásmido: primera agrupación formada por *terA*, *terB*, *terC*, *terE*, *terF* y *terZ*; y segunda por *terY*, *terY2*, *terY3* y *terX* (figura 18).

En la figura 18 se representa la estructura del plásmido IncP identificado en el aislado *E. coli* ZTA18/02050RS.

Figura 18. Reconstrucción del plásmido IncP.

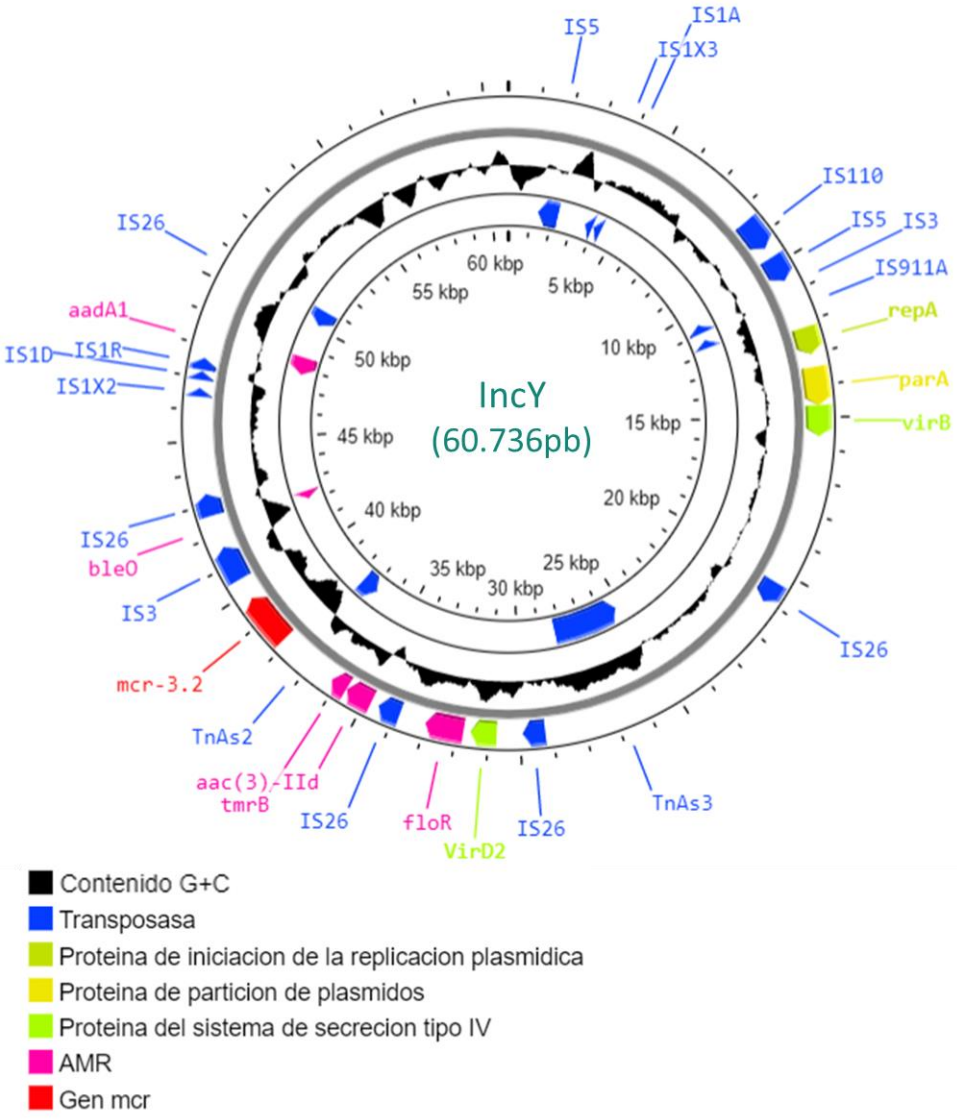


Reconstrucción del plásmido IncP del aislado ZTA18/02050RS (*E. coli*) portador de un gen *mcr-1.1.* La escala del círculo interno indica el número de bases del que se compone el plásmido. Las flechas de colores representan los genes de esta estructura. En esta reconstrucción se representan genes de resistencia a antimicrobianos (AMR), así como el gen *mcr-1.1*, ISs y genes de resistencia a metales pesados. El color negro indica el contenido en guanina – citosina (GC) del plásmido.

En el caso de IncY, los genes de resistencia a antimicrobianos que presentaba fueron *aac(3)-IId* y *aadA1*; *bleO* (resistencia a bleomicina); *floR;* y *tmrB* (resistencia a tunicamicina). A diferencia del resto de genes *mcr* de los otros tipos de plásmido, el gen *mcr-3.2* se encontró junto al gen *bleO* en la siguiente estructura: Tn*As2 – mcr-3.2 – IS3 – bleO – IS26*. (figura 19). No se detectaron genes de resistencia a metales pesados

En la figura 19 se representa a modo de ejemplo la estructura del plásmido IncY identificado en el aislado de *E. coli* ZTA15/01169-1EB1.

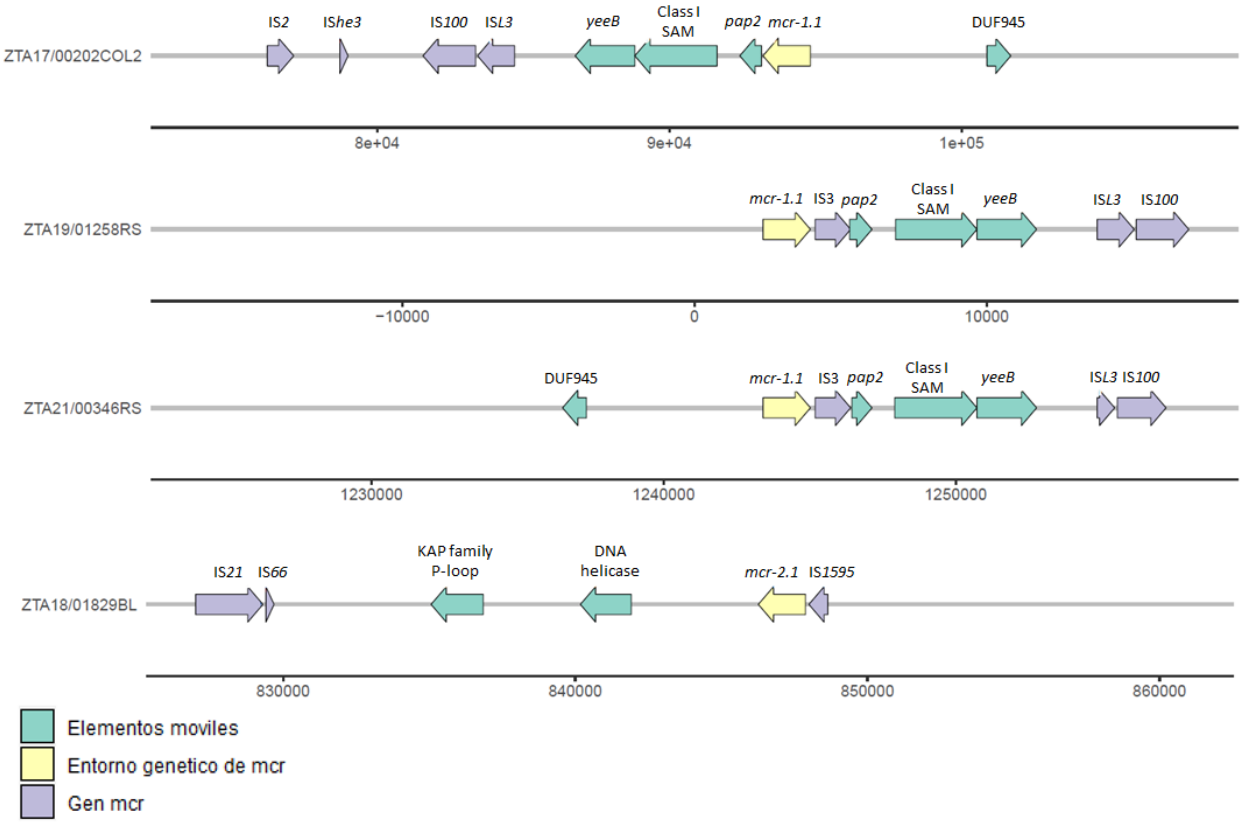
Figura 19. Reconstrucción del plásmido IncY.



Reconstrucción del plásmido IncY del aislado ZTA15/01169-1EB1 (*E. coli*) portador de un gen *mcr-3*.2. La escala del círculo interno indica el número de bases del que se compone el plásmido. Las flechas de colores representan los genes de esta estructura. En esta reconstrucción se representan genes relacionados con la replicación y la movilidad del plásmido por conjugación, secuencias de inserción, genes de resistencia a antimicrobianos (AMR), así como el gen *mcr-3.2.* El color negro indica el contenido en guanina – citosina (GC) del plásmido.

Por último, los cuatro plásmidos cuyo tipo de replicón no pudo ser determinado resultaron ser transferibles no conjugativos, dado que carecían de MPF y *oriT* y los cuatro presentaron relaxasa de tipo MOBp. De estos cuatro plásmidos, los tres que albergaban el gen de resistencia *mcr-1.1* presentaron el mismo entorno genético, manteniendo el mismo orden y orientación de cada uno de los genes que acompañaban a *mcr-1.1* y flanqueados por ISs (figura 20, situación similar a la que se observaba con el entone genético de *mcr-2.1*.

Figura 20. Entorno genético de los genes *mcr* en plásmidos no identificados.

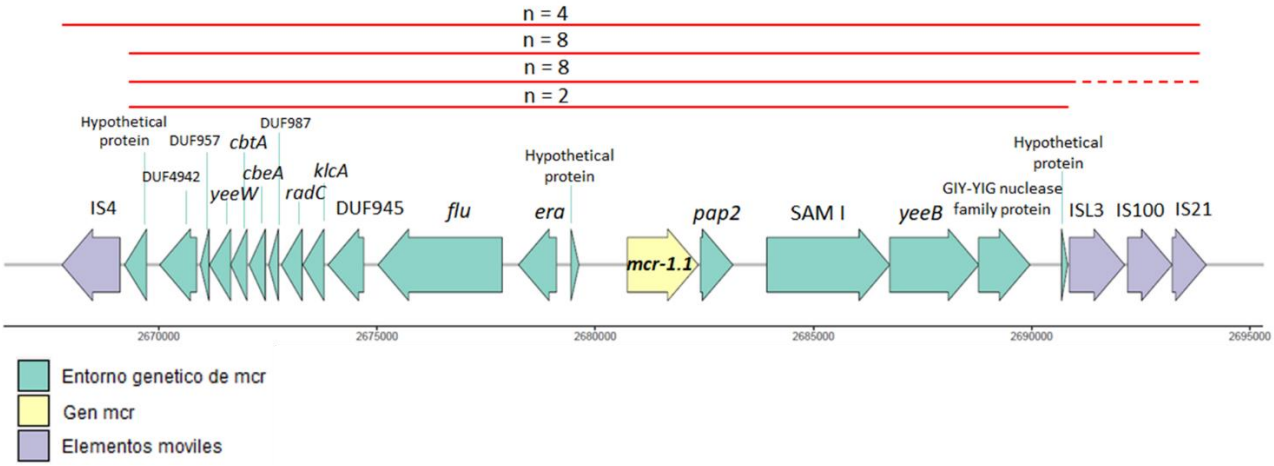


Esquema del entorno genético de los genes de la familia *mcr* localizados en cuatro plásmidos cuyo tipo de replicón no pudo ser determinado. En la figura las flechas representan genes y la punta indica su orientación en el plásmido. Las cuatro secuencias de genes están alineadas en función de los genes *mcr* y en la parte inferior de cada una se representa la escala de pares de bases donde se ubica cada elemento.

4.4.7. Genes *mcr* localizados en el cromosoma bacteriano

Se ha detectados el gen *mcr-1.1* en el cromosoma en 26 aislados. En 22 se encontraba entre un dominio DUF945 y el gen *pap2*, junto a los genes que codifican las proteínas metiltranferasa dependiente de ADN SAM clase I y helicasa (gen *yeeB*), manteniendo siempre este mismo orden de aparición o invirtiéndose, dependiendo de la orientación de los genes en el ADN (figura 21). En los cuatro aislados restantes no se detectó la presencia de los genes codificantes de la metiltransferasa SAM I y helicasa y, en dos de estos aislados, tan solo se identificó el gen *pap2* junto al *mcr-1.1*. En 24 de estos aislados se identificaron ISs localizadas en las proximidades de los genes *mcr-1.1*, siendo IS*4*, IS*3*, IS*L3*, IS*21*, IS*100* e IS*Cro1* los tipos más comunes, y siempre localizadas en el mismo orden respecto al gen *mcr-1.1*, tal como se representan en la figura 21. En los dos aislados restantes, no se identificaron ISs en las proximidades de *mcr-1.1*.

Figura 21. Entorno genético del gen *mcr-1.1* en el cromosoma bacteriano.

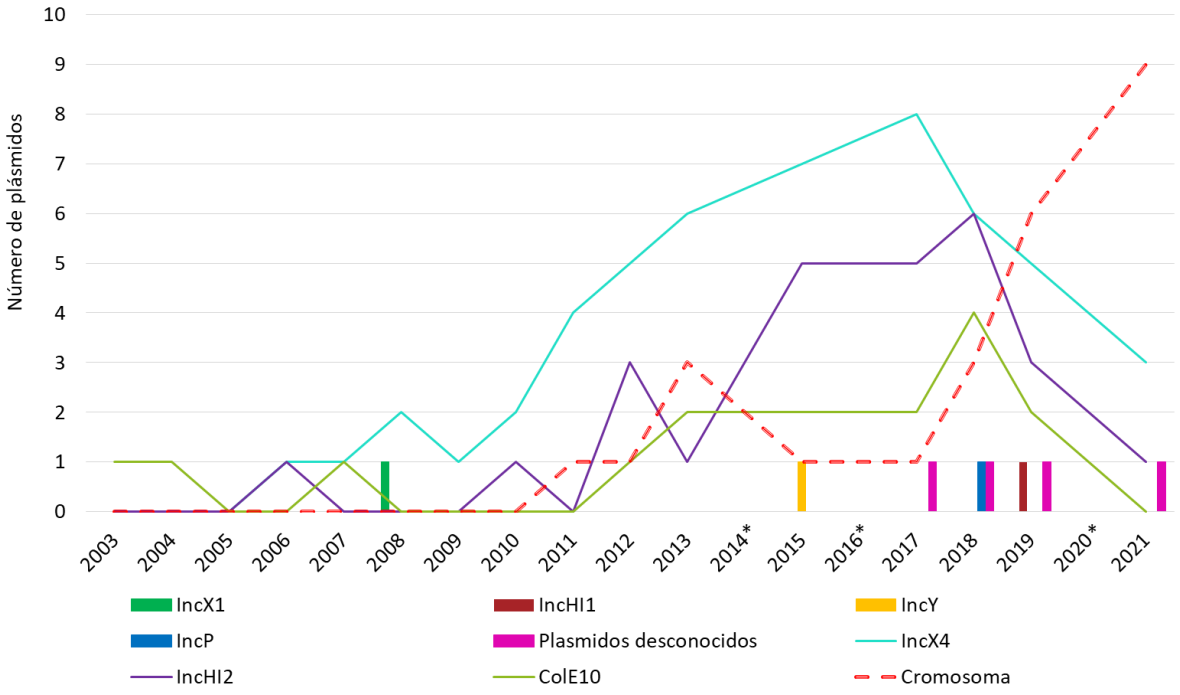


Esquema del entorno genético de los genes *mcr-1.1* identificado en el cromosoma bacteriano de 22 aislados. En la figura las flechas representan genes y la punta indica su orientación en el plásmido. En la parte inferior se representa la escala de pares de bases donde se ubica cada elemento. Las líneas rojas continuas indican diferentes agrupaciones de elementos del gráfico comunes a un número determinado de aislados (n). La línea roja discontinua indica que para un número determinado de aislados (n) la presencia de alguno de los tres elementos móviles incluidos (IS*L3*, IS*100* e IS*21*) es variable, pudiendo ser sustituido por otro tipo de IS.

4.5. Evolución temporal de los plásmidos portadores de genes *mcr*

Atendiendo al año de obtención de cada aislado secuenciado se apreciaron variaciones en los plásmidos portadores de los genes *mcr* (figura 22). El primer gen de la familia *mcr* identificado en este estudio fue *mcr-4.3* (2003), en un plásmido de tipo ColE10 de un aislado de *E. coli*, mientras que los primeros genes *mcr-1* se detectaron en 2006 en plásmidos de tipo IncX4 e IncHI2 en dos aislados de *E. coli*.

Figura 22. Evolución de la localización de los genes *mcr* entre 2003 y 2021 en muestras de contenido cecal de origen porcino.



Teniendo en cuenta las variantes *mcr* identificadas y su localización (plásmido o cromosoma bacteriano), se apreciaron cambios en ambos aspectos a lo largo del tiempo.

Mientras que entre los años 2003 y 2007 *mcr-1* y *mcr-4* presentaban proporciones similares (de seis aislados resistentes a colistina, tres portaban *mcr-1* y tres *mcr-4*), a partir del año 2008 *mcr-1* comienza a aumentar su frecuencia de aparición con respecto a *mcr-4* y al resto de variantes.

Desde 2006 hasta 2017, *mcr-1* se encontraba principalmente en plásmidos de tipo IncX4 (n = 37), casi todos ellos auto-conjugativos (35). Este periodo se inició con un aislado portador de *mcr-1* en

un plásmido IncX4 y en 2017 se detectó el número máximo (ocho). A partir de 2018 comienza a disminuir esta localización hasta obtener tres *mcr-1* en plásmidos de tipo IncX4 en 2021 (figura 22).

En cuanto a *mcr-1* en plásmidos de tipo IncHI2, solo se observaron en dos aislados antes del año 2012 (uno en 2006 y otro en 2010). A partir de 2012 este tipo de plásmidos comienzan a aumentar como portadores de *mcr-1,* pasando de tres plásmidos en 2012 a seis en 2018 (en 2013 sólo se detectó un plásmido). Los plásmidos IncHI2 identificados en este periodo (2012 - 2018) fueron 20 (17 de ellos auto-conjugativos y tres no transferibles). A partir del año 2019 disminuyó el número de plásmidos IncHI2 hasta encontrar sólo uno en 2021 (figura 22).

El tercer tipo de plásmido más frecuente, ColE10, no mostró grandes variaciones a lo largo del tiempo. El número de aislados portadores de genes *mcr* en plásmidos de tipo ColE10 (todos ellos *mcr-4*) alcanzó su máximo en 2018 (n = 4), año a partir del cual su número comenzó a disminuir, no observandose ningún aislado portador en 2021 (figura 22).

Aunque en los años 2011, 2012, 2013 y 2015 ya se detectaron genes *mcr-1* localizados en el cromosoma (n=1, n=1, n=2 y n= 1, respectivamente), no fue hasta el periodo comprendido entre 2017 y 2021, cuando este número aumentó desde un aislado en 2017 hasta nueve en 2021.

Además de este cambio de localización, a partir del año 2017 también se observa la aparición de otro tipo de plásmidos que albergaban genes *mcr* (IncHI1, IncP y cuatro plásmidos de tipo de replicón indeterminado), contribuyendo así al aumento de la diversidad de plásmidos en que se encontraban estos genes de resistencia, sumándose a los plásmidos de tipo IncX1 e IncY identificados previamente en los años 2008 y 2015 respectivamente.

Por tanto, entre 2017 y 2018 se apreció un cambio en la localización de los genes *mcr*, disminuyendo su presencia en plásmidos y aumentando en el cromosoma bacteriano.

4.6. Estudio experimental de la capacidad de diseminación de aislados resistentes a colistina portadores del *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina

Para llevar a cabo este estudio se emplearon 100 pollos de un día de vida que fueron divididos en cuatro grupos de 25 animales (G1, G2, G3, and G4) sometidos a diferentes intervenciones según se describe en el apartado 3.2.4.1. Todos los animales mostraron resultados negativos a la presencia de *Salmonella* spp. en el cribado llevado a cabo a su llegada al centro. Como ya se ha indicado, teniendo en cuenta que durante el periodo de adaptación los animales fueron criados bajos las mismas condiciones, todos los animales hasta el día 7 (primera intervención) fueron considerados como grupo control (CTRL). De los 100 pollos con los que comenzó el estudio, 13 pertenecientes al grupo CTRL fueron excluidos tras realizar la necropsia al séptimo día, ya que no se pudo obtener la cantidad mínima de muestra necesaria (al menos 100 mg) para llevar a cabo una correcta extracción de ADN. Por tanto, finalmente fueron incluidos en el ensayo 87 animales (CTRL=7; G1=20; G2=20; G3=20; G4=20). Estos datos se encuetran disponibles en la tabla VIII del anexo V.

4.6.1. Recuento de *Salmonella* spp. en placa

Los resultados del análisis de *Salmonella* spp. se recogen en la tabla 26.

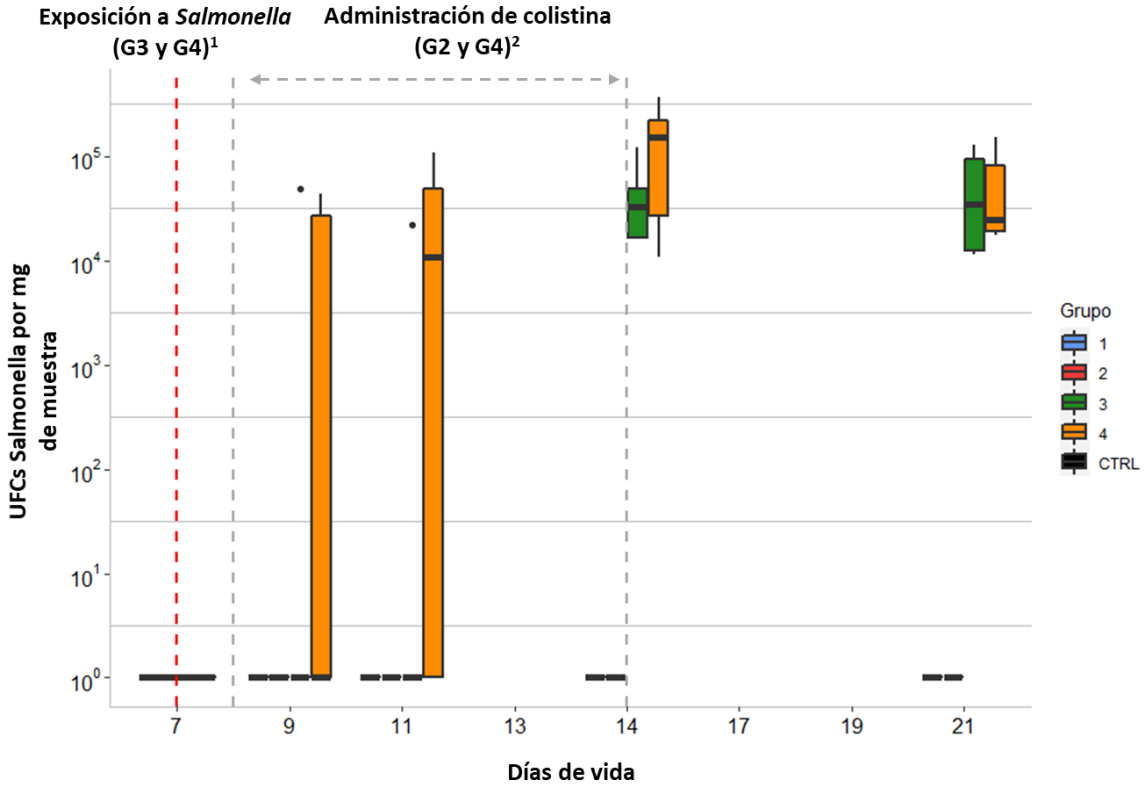
Tabla 26. Resultados del recuento de *Salmonella* spp. por día de vida.

	Exp. Salmonella (Día 7)*	Admin. colistina (Días 8 a 14)**	UFC/mg (Log10)																	
			Día 7 [1] (n = 7)				Día 9 (n = 20)				Día 11 (n = 20)				Día 14 (n = 20)				Día 21 (n = 20)			
			$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*
CTRL[2]	No	No	2,0	<2,0	<2,0	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G1	No	No	-	-	-	-	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
G2		Sí	-	-	-	-	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
G3	Sí	No	-	-	-	-	4,0	<2,0	<2,0	4,7	3,6	<2,0	<2,0	4,3	4,7	4,5	4,2	5,1	4,8	4,5	4,1	5,1
G4		Sí	-	-	-	-	4,2	<2,0	<2,0	4,6	4,5	4,0	<2,0	5,0	5,2	5,2	4,0	5,6	4,8	4,4	4,2	5,2

$\bar{x}$: media; M_e: mediana; m: mínimo; M: máximo; NA: datos no aplicables dada la ausencia de animales a analizar; *Exposición a la cepa de *S*. Typhimurium; **Administración de la colistina en agua; [1]el grupo CTRL estaba formado por diferente número de individuos debido a la imposibilidad de obtener suficiente cantidad de muestra en 13 animales. En el resto de días, los muestreos se compusieron de cinco animales por grupo; [2]los resultados del grupo CTRL solo son válidos para el D7. Después, los animales fueron incluidos en los grupos (G1 a G4) dependiendo de las condiciones experimentales a las que fueron expuestos. UFC: unidades formadoras de colonias.

Sólo las muestras de los animales pertenecientes a los grupos G3 y G4 (a los que se les administró agua de bebida contaminada con la cepa ZTA14/00045, *S.* Typhimurium portadora del gen *mcr-1*) mostraron crecimiento en los cultivos realizados en medio selectivo SMID2 (tabla XI, anexo V). Las diferencias entre los recuentos en placa de *Salmonella* de ambos grupos no fueron estadísticamente significativas (p > 0,05). Los pollos del grupo G4 tuvieron mayores valores de recuento en los días 9 y 14, siendo en este último día en el que se observaron los recuentos más elevados. No obstante, tras la retirada de la administración de colistina (día 14), ambos grupos de animales mostraron recuentos de *Salmonella* spp. similares en el día 21 (figura 23).

Figura 23. Resultados del recuento de *Salmonella* spp. en placa durante 21 días en muestras de contenido cecal de pollos.



CTRL: grupo control; Grupo 1 (G1): animales en ausencia de colistina no expuestos a *Salmonella* spp.; grupo 2 (G2): animales con administración de colistina no expuestos a *Salmonella* spp.; grupo 3 (G3); animales expuestos a *Salmonella* spp. en ausencia de colistina; grupo 4 (G4): animales expuestos a *Salmonella* spp. con administración de colistina. Los puntos (●) representan valores extremos; [1]la exposición a *Salmonella* spp. comenzó el día 7 en los grupos G3 y G4 (el muestreo del día 7 fue llevado a cabo antes del comienzo de la exposición a *Salmonella* spp.); [2]la colistina fue administrada a los animales de los grupos G2 y G4 desde el día 8 hasta el día 14.

Asimismo, se comprobó por PCR convencional la presencia del gen *mcr-1* en al menos un aislado de *Salmonella* spp. obtenido en las placas de recuento, siendo todos ellos portadores del gen. De esta forma se confirmó que la colonización del intestino de estos animales por *Salmonella* spp. se debía a la cepa introducida artificialmente en este ensayo.

4.6.2. Cuantificación directa en heces del gen *mcr-1* por qPCR

Los resultados de la cuantificación del gen *mcr-1* en los siete animales del grupo CTRL y los 20 del G1 (pollos libres de *Salmonella* spp. a los que no se les administró colistina) mostraron una elevada variabilidad individual (tabla IX, anexo V). Todos los animales del grupo CTRL permanecieron por debajo del límite de cuantificación, mientras que cuatro de los 20 animales que componían el grupo G1 mostraron niveles cuantificables del gen, variando entre $6{,}7 \times 10^3$ y $1{,}6 \times 10^6$ copias/mg de contenido cecal. De los 16 animales restantes del G1 no se obtuvo señal de amplificación del gen, o estaba por debajo del límite de cuantificación, siendo considerados como negativos (tabla 27).

Tabla 27. Resultados de la cuantificación mediante qPCR del gen *mcr*-1 por día de vida.

	Exp. Salmonella (Día 7)*	Admin. colistina (Días 8 a 14)**	Copias de *mcr-1*/mg (Log10)																	
			Día 7[1] (n = 7)				Día 9 (n = 20)				Día 11 (n = 20)				Día 14 (n = 20)				Día 21 (n = 20)			
			$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*	$\bar{x}$	M_e	*m*	*M*
CTRL[2]	No	No	2,0	< 2,0	< 2,0	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G1	No	No	-	-	-	-	2,5	2,6	< 2,0	< 2,0	5,5	2,5	< 2,0	7,1	3,8	2,5	< 2,0	4,3	3,2	< 2,0	< 2,0	3,2
G2		Sí	-	-	-	-	< 2,0	< 2,0	< 2,0	5,9	6,4	2,8	< 2,0	5,2	3,7	< 2,0	4,5	5,7	2,6	< 2,0	5,2	5,8
G3	Sí	No	-	-	-	-	5,3	< 2,0	< 2,0	4,7	4,5	2,9	4,2	5,9	5,3	5,2	5,2	6,8	5,5	5,3	5,0	6,2
G4		Sí	-	-	-	-	4,2	3,0	< 2,0	2,8	5,5	5,4	< 2,0	6,2	6,4	6,0	2,3	4,4	5,7	5,3	5,0	3,9

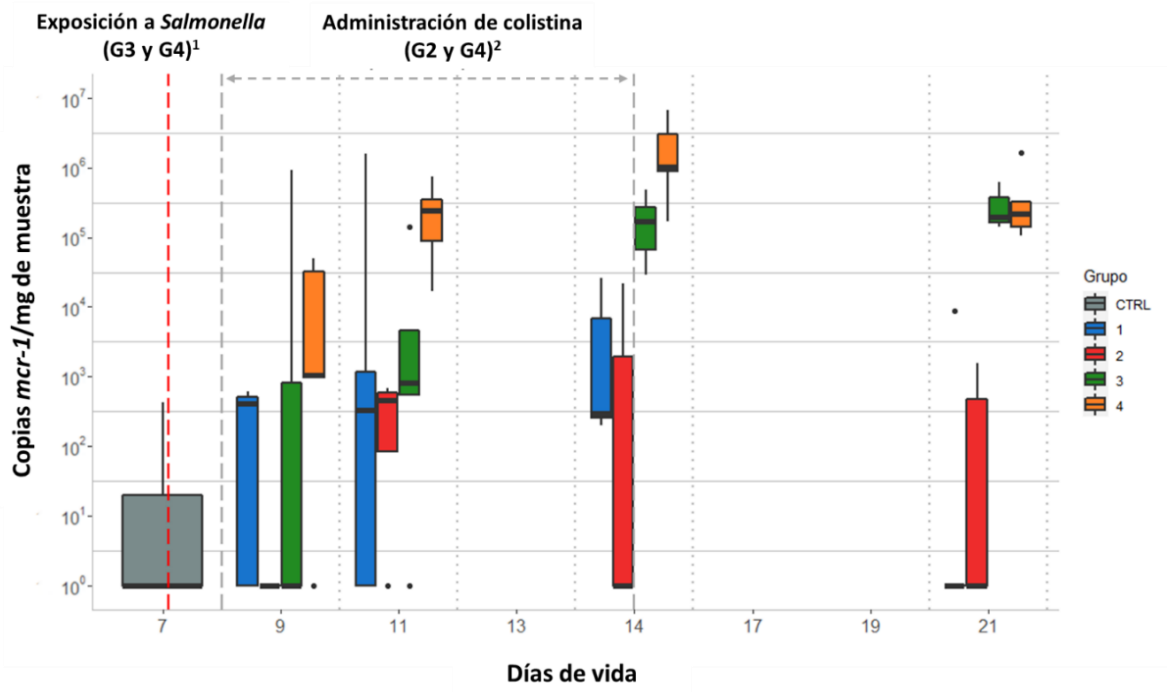
$\bar{x}$: media; M_e: mediana; m: mínimo; M: máximo; NA: datos no aplicables dada la ausencia de animales a analizar; *Exposición a la cepa de *S*. Typhimurium; **Administración de la colistina en agua; [1]el grupo CTRL estaba formado por diferente número de individuos debido a la imposibilidad de obtener suficiente cantidad de muestra de 13 animales. En el resto de días, los muestreos se compusieron de cinco animales por grupo; [2]los resultados del grupo CTRL solo son válidos para el D7. Después, los animales fueron incluidos en los grupos (G1 a G4) dependiendo de las condiciones experimentales a las que fueron expuestos.

Los resultados de cuantificación de *mcr-1* en los grupos que no fueron contaminados con *Salmonella* spp. (G1 y G2) fueron similares en todos los muestreos llevados a cabo a lo largo del estudio, alcanzando los valores máximos en el día 11 ($3{,}2 \times 10^5$ y $2{,}6 \times 10^6$ copias/mg de contenido cecal respectivamente) (tabla 27). Así, a pesar de haberse administrado colistina en el grupo G2,

no se observaron diferencias significativas en los 21 días de ensayo con respecto al grupo G1 no tratado (p = 0,23).

Respecto a los grupos contaminados con la cepa de *S*. Typhimurium ZTA14/00045 (G3 y G4), en los animales del grupo G3 (no tratados con colistina), aumentó la cantidad de *mcr-1* desde valores inferiores a $1{,}0 \times 10^2$ en el día 9 hasta $1{,}9 \times 10^5$ copias/mg en el día 21. En ese mismo periodo, este gen en animales del grupo G4 (tratados con colistina) aumentó desde $1{,}5 \times 10^3$ hasta $2{,}1 \times 10^5$ copias/mg. Las mayores diferencias entre estos dos grupos tuvieron lugar en los días 11 y 14, coincidiendo con el final del tratamiento con colistina, donde los animales del grupo G4 mostraron niveles de *mcr-1* significativamente mayores que los del G3 ya que, como se puede observar en la figura 24, la mediana de estos valores en el grupo G4 se encuentra fuera de rango intercuartil del resto de grupos.

Figura 24. Resultados de la cuantificación mediante qPCR del gen *mcr-1* obtenidos por día de vida en los diferentes grupos del ensayo.



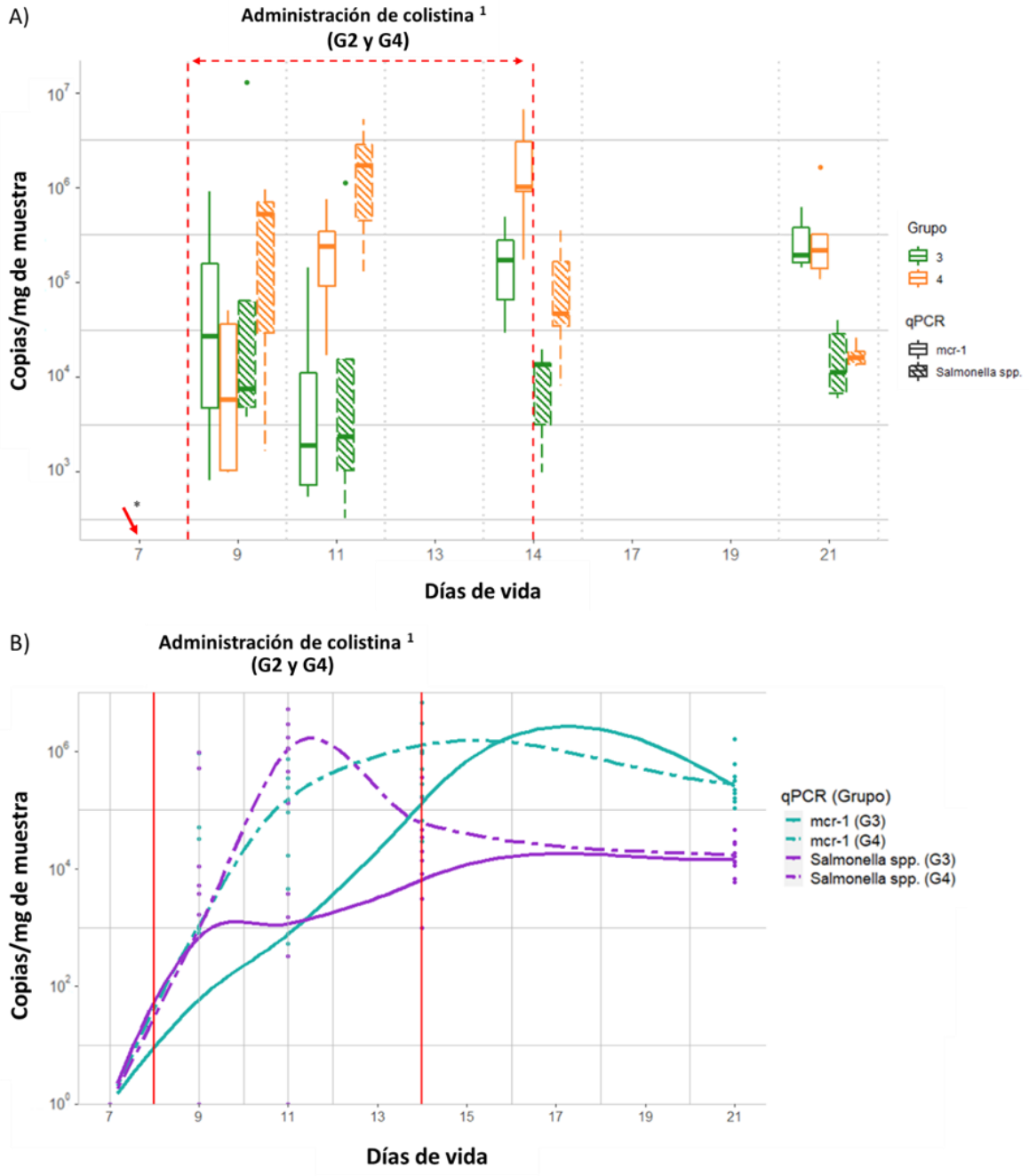
CTRL: grupo control; grupo 1 (G1): animales en ausencia de colistina no expuestos a *Salmonella* spp.; grupo 2 (G2): animales con administración de colistina no expuestos a *Salmonella* spp.; grupo 3 (G3); animales expuestos a *Salmonella* spp. en ausencia de colistina; grupo 4 (G4): animales expuestos a *Salmonella* spp. con administración de colistina. Los puntos (●) representan valores extremos; [1]la exposición a *Salmonella* spp. comenzó el día 7 en los grupos G3 y G4 (el muestreo del día 7 fue llevado a cabo antes del comienzo de la exposición a *Salmonella* spp.); [2]la colistina fue administrada a los animales de los grupos G2 y G4 desde el día 8 hasta el día 14.

4.6.3. Cuantificación de *Salmonella* spp. mediante qPCR y análisis de su relación con la detección del gen *mcr-1* usando qPCR

Las medianas de la cuantificación de *Salmonella* spp. por qPCR en el grupo G3 fueron de < 3,3 × 10^2; 5,1 × 10^3; 1,5 ×10^3; 1,3 × 10^4 y 1,1 × 10^4 copias/mg en los muestreos de los días 7, 9, 11, 14 y 21 respectivamente. En el caso del G4, las medianas fueron < 3,3×10^2; 1,7 × 10^3; 1,7 × 10^6; 4,7 × 10^4 y 1,6 × 10^4 copias/mg en los días 7, 9, 11, 14 y 21, respectivamente (figura 25A).

La cantidad de *Salmonella* spp. en pollos del grupo G4 fue mayor que la del grupo G3, como puede observarse en los resultados de cuantificación de *Salmonella* spp. mediante qPCR (figura 25A). Comparando la cantidad de *Salmonella* spp. detectada con los resultados de cuantificación del gen *mcr-1*, los valores son similares en el día 9 ($p > 0,05$; tabla 28), lo que sugiere que la mayoría de las copias del gen *mcr-1* presentes en la muestra podrían proceder de la cepa de *S.* Typhimurium inoculada.

Figura 25. Comparación entre resultados de qPCR para *Salmonella* spp. y el gen *mcr-1* obtenidos en los grupos de animales expuestos a *Salmonella* spp. (G3 y G4).



A) Cuantificación mediante qPCR de *Salmonella* spp. y *mcr-1* obtenidos por día de vida; los puntos (●) representan valores extremos; B) representación de los datos de cuantificación de *Salmonella* y *mcr-1* mediante el método "*Loess*" (*Locally Estimated Scatterplot Smoothing*); grupo 3 (G3): animales expuestos a *Salmonella* spp. en ausencia de colistina; grupo 4 (G4): animales expuestos a *Salmonella* spp. con administración de colistina. [1]La colistina fue administrada a los animales del grupo G4 desde el día 8 hasta el día 14; * la exposición a *Salmonella* spp. comenzó el día 7 en los grupos G3 y G4 (el muestreo del día 7 fue llevado a cabo antes del comienzo de la exposición a *Salmonella* spp.).

A partir del día 11, los niveles de *mcr-1* y de *Salmonella* spp. aumentaron significativamente en el grupo G4 (tabla 28), coincidiendo con el periodo de administración de colistina, mientras que en el grupo G3 apenas variaron respecto al día 9, manteniéndose prácticamente invariables hasta el final del ensayo (día 21). Tras la retirada del tratamiento con colistina (día 14), los niveles de *Salmonella* spp. detectados en el grupo G4 comenzaron a disminuir hasta valores similares a los obtenidos en los pollos del grupo G3 en el día 21 ($p > 0,05$; tabla 28).

Tabla 28. Valores *p* derivados de la Prueba T obtenidos del análisis comparativo de la cuantificación del gen *mcr-1* y de *Salmonella* spp.

		Valor *p*			
qPCR	**Grupo**	**[1]D9**	**[1]D11**	**[1]D14**	**[1]D21**
mcr-1	G3 *vs.* G4	0,409	0,032*	0,023*	0,861
***Salmonella* spp.**	G3 *vs.* G4	0,693	0,019*	0,034*	0,687
***mcr-1 vs. Salmonella* spp.**	G3	0,061	0,436*	0,000*	0,000*
***mcr-1 vs. Salmonella* spp.**	G4	0,941	0,000*	0,000*	0,004*

[1] D7, D9, D11, D14 y D21 corresponde a los muestreos llevados a cabo en los días 7, 9, 11, 14 y 21, respectivamente; *diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Atendiendo a la cuantificación del gen *mcr-1*, se observó un aumento significativo en el grupo G3 el día 14 respecto al día 11 ($p = 0,028$), que se mantuvo hasta el día 21. En el caso de los animales del grupo G4, se observó un aumento significativo de la cuantificación de *mcr-1* en el día 11 respecto al día 9 ($p = 0,028$), que siguió observándose en el día 14 respecto al día 11 ($p = 0,047$), incremento que se produjo con antelación en comparación con los datos obtenidos en el grupo G3. En el día 21, sin embargo, se observó un descenso en la cuantificación de *mcr-1* en el grupo G4, equiparándose a la cuantificación de copias del gen obtenida en el grupo G3. Finalmente, en el día 21, se pudo observar que la cuantificación de copias del gen *mcr-1* era significativamente mayor que la cuantificación de *Salmonella* spp. (figura 25B). Estos resultados se encuentran disponibles en la tabla X del anexo V y además han sido publicados (Miguela-Villoldo *et al.*, 2021 [apartado I, anexo VI]).

5. DISCUSIÓN

5.1. Caracterización fenotípica y molecular de enterobacterias resistentes a colistina

En los dos ceparios analizados (RESCOL y COLR) se detectaron perfiles de multirresistencia en más del 95% de los aislados, mostrando resistencia a una media de seis familias de antimicrobianos. Este hallazgo es similar al descrito por Timmermans *et al.* (2021) (98) en aislados de *E. coli* resistentes a colistina, obtenidos de muestras de heces de animales de abasto en Bélgica, donde más del 80% mostraron multirresistencia frente al menos seis grupos de antimicrobianos. Atendiendo a los perfiles de resistencia obtenidos en esta tesis, los antibióticos frente a los que se han observado mayores porcentajes de resistencia (además de colistina), fueron ampicilina, tetraciclina y sulfametoxazol, con más del 80% de aislados resistentes en ambos ceparios, así como trimetoprim y cloranfenicol con porcentajes superiores al 65%. Estos datos también son similares a los obtenidos por Timmermans *et al.* (2021) (98), así como a los estudios de Vidal *et al*. (2020) y Aguirre *et al.* (2020) llevados a cabo en lechones con diarrea neonatal y post-destete en España (159, 160) o en aves de corral en China, como el de Shafiq *et al.* (2021) (161). En estos trabajos también observaron elevados porcentajes de resistencia en aislados de *E. coli* frente a los mismos antimicrobianos analizados en esta tesis doctoral. Estas moléculas han sido comúnmente utilizadas en ganadería para el tratamiento de enfermedades infecciosas en los animales de producción en España y en la mayor parte de los países de la UE (122, 162-164), por lo que el uso de antimicrobianos en ganadería podría haber contribuido a la selección y el mantenimiento de bacterias resistentes a colistina y otros antimicrobianos (multirresistentes) en animales (107, 165, 166). Otro factor que puede favorecer el mantenimiento de estas bacterias en aislados de origen animal es el uso de metales pesados en los piensos, ya que algunos han sido empleados frecuentemente como aditivos para la alimentación animal. Estas sustancias (como el cobre, la plata o el zinc) se pueden incluir en la dieta de los animales para promover su crecimiento y mejorar sus condiciones de salud, gracias a sus propiedades antimicrobianas (107, 167). La coexistencia en el mismo plásmido de genes de resistencia a antimicrobianos y a metales pesados o genes que codifican bombas de eflujo de amplio espectro que permiten la expulsión de diferentes cationes metálicos con el mismo mecanismo, podría promover la dispersión de genes de resistencia a antibióticos mediante fenómenos de co-selección, como así indican algunos

estudios (107, 168). La posible co-selección de estos genes junto a los *mcr* se discute en mayor profundidad el apartado 5.2 de esta discusión.

Atendiendo a la distribución de especies obtenidas, *E. coli* fue la especie resistente a colistina identificada con mayor frecuencia en los ceparios RESCOL y COLR, como ya ha sido señalado en otros estudios en los que esta bacteria es la más frecuentemente aislada en países de todo el mundo cuando se estudia la resistencia a colistina en enterobacterias procedentes de animales de abasto (69, 169).

K. pneumoniae es otra especie importante debido al aumento del número de aislados productores de carbapenemasas en la última década, lo cual la convierte en una preocupación de Salud Pública, sobre todo en medicina humana (170, 171). Esta especie, que tiene mayor representación en el cepario COLR que en el cepario RESCOL (que solo cuenta con un aislado), fue junto a *E. coli*, la especie bacteriana aislada con más frecuencia en los muestreos de ganado porcino, hecho que contrasta con lo descrito en otros estudios donde la identificación de esta especie bacteriana en cerdos es infrecuente (78, 172). Los aislados de esta especie incluidos en el cepario COLR mostraron una gran variedad de perfiles de resistencia, todos ellos multirresistentes, concordando con la información recogida en las revisiones de Li *et al.* (2006) (15) y Nation *et al.* (2009) (16), donde la elevada frecuencia de aislados de *K. pneumoniae* multirresistentes, procedentes de muestras clínicas hospitalarias, además de *P. aeruginosa* y *A. baumanni*, fueron uno de los principales motivos por los que se reintrodujo la colistina en medicina humana.

En cuanto a la frecuencia de detección de los genes de resistencia a colistina de la familia *mcr*, la variante *mcr-1* mostró una clara predominancia sobre el resto de genotipos de la familia, ya que estaba presente en más del 80% de los aislados de los ceparios RESCOL y COLR. Desde su primera descripción en 2015 en un aislado de *E. coli* procedente de una muestra de ganado porcino en China (70), este gen ha sido descrito en todo el mundo, sobre todo en enterobacterias comensales obtenidas a partir de muestras de animales para el consumo humano, convirtiéndose en la variante de la familia *mcr* con mayor grado de dispersión mundial (68, 69, 173, 174). En esta tesis, la proporción de *mcr-1* detectado en ambas colecciones de aislados fue significativamente mayor a la del resto de genes de la familia, dato que concuerda con la información recogida en las revisiones llevadas a cabo por Skov *et al.* (2016), tres meses después de la primera descripción del gen *mcr-1* en 2015 (67), y por Ling *et al.* (2020), cuando ya habían sido descritas hasta nueve variantes de la familia *mcr* en 2020 (68). En ambas revisiones destaca la elevada capacidad de dispersión y la abundancia de este gen comparado con las otras variantes de la familia *mcr*.

La mayoría de los genes *mcr-1* fueron identificados en aislados de *E. coli*, tanto en el cepario RESCOL como en el COLR. Tal como se describe en estudios epidemiológicos que emplean datos derivados de programas de vigilancia de resistencia a colistina, esta especie constituye un elemento clave en la dispersión de estos genes de resistencia, especialmente de *mcr-1*, ya que parece contar con un mayor potencial para albergar y distribuir genes de resistencia a colistina de la familia *mcr* (67, 173, 175). *E. coli* ha llegado a ser la bacteria portadora de genes *mcr* más frecuente en todo el mundo, considerándose como uno de los principales reservorios de estos genes (8, 30, 70, 111, 175, 176). Otros estudios llevados a cabo con aislados de *E. coli* de casos de colibacilosis en lechones con diarrea post-destete (33, 97), así como la información recogida en revisiones realizadas sobre resistencia a colistina en *Enterobacteriaceae* (105, 174), apuntan a una mayor frecuencia del gen *mcr-1* sobre el resto de las variantes, tanto en aislados de *E. coli* obtenidos de muestras clínicas, como de animales sanos.

El resto de genes *mcr* tuvo una menor representación al analizar los aislados que componen los ceparios RESCOL y COLR, al igual que se ha observado anteriormente en Europa, donde estos genes presentaban frecuencias de aparición menores a la de *mcr-1* (68), como es el caso de *mcr-4* (74), *mcr-6* (76), *mcr-7* (77), *mcr-8* (78, 177), así como el gen *mcr-2*, el cual contaba con escasas descripciones en Europa (71), a excepción del particular caso de Bélgica, donde se detectó una mayor presencia de este gen en aislados de *E. coli* de cerdos y terneros respecto al resto de países europeos (68, 71). En el caso concreto de *mcr-2* en España, no había descripciones en bacterias procedentes de animales hasta 2019, cuando se publicó el trabajo de Miguela-Villoldo *et al*., 2020 (incluido en esta tesis doctoral en el apartado I del anexo VI), describiendo el primer aislado de *E. coli* portador del gen obtenido a partir de una muestra de contenido cecal de cerdo de la colección COLR (apartado 4.1.2.3).

Las variantes *mcr-3* y *mcr-5* que, tras el gen *mcr-1,* son las que presentan una mayor dispersión geográfica (68), no fueron detectadas en un principio en los ceparios incluidos en la tesis. En el caso del gen *mcr-5*, se detectó con posterioridad al ampliar la selección de aislados para su secuenciación genómica, por lo que se discutirá en el apartado 5.2. Por otro lado, la variante *mcr-3* se detectó en un aislado de *E. coli* del cepario RESCOL, con una similitud en la secuencia de nucleótidos del gen del 99,94% con la primera descripción realizada por Yin *et al.* (2017) (73), siendo denominada variante *mcr-3.2*. Cabe destacar que este gen fue identificado junto al gen *mcr-1*, ubicándose ambos genes en diferentes plásmidos dentro del mismo aislado, siendo la primera descripción en Europa de aparición conjunta de dos genes de la familia *mcr* (Hernández

et al., 2017). Esta publicación se incluye en el listado de trabajos situado en el apartado I del anexo VI.

En ambos ceparios la mayoría de los aislados resistentes a colistina que albergaban genes *mcr* presentaron valores de CMI frente a colistina de 4 y 8 mg/L, los cuales se asocian normalmente a la presencia de estos genes, los cuales parecen otorgar un nivel moderado de resistencia a colistina (37, 70, 178). Estos valores de CMI son comunes en todas las especies bacterianas incluidas en ambos ceparios y cuya resistencia a colistina se debe a la presencia de genes *mcr*, observando, además, que la presencia de dos genes *mcr* en el mismo aislado no supone un aumento en los valores de CMI observados. Otros estudios coinciden en este hallazgo, observando bacterias con dos genes *mcr* detectados conjuntamente en el mismo aislado, tanto de la misma variante como de dos variantes distintas, y que mostraban valores de CMI de 4 y 8 mg/L, respectivamente (131, 179).

En el caso de *K. pneumoniae,* la ausencia de genes *mcr* en la mayoría de aislados, junto a los elevados valores de CMI frente a colistina, son características comunes en esta especie bacteriana y pueden asociarse a mutaciones puntuales en genes involucrados en la síntesis de la membrana externa de la pared bacteriana (55, 63). Uno de los mecanismos de resistencia adquirida a colistina más comúnmente descritos en esta especie bacteriana son las mutaciones en los genes del sistema de doble componente *pmrAB*/*phoPQ* y en el represor de este sistema, el gen *mgrB* (31, 55), cuya inactivación desemboca en la adición de una L-Ara4N al LPS, causando resistencia a colistina. Así, las especies de *K. pneumoniae* resistentes a colistina pueden presentar hasta cinco veces más cantidad de L-Ara4N que las bacterias sensibles, pudiendo aumentar su CMI hasta 256 mg/L, valores elevados en comparación con los que suelen otorgar los genes *mcr,* que oscilan entre 4 y 8 mg/L (37, 65, 66).

Otro género bacteriano presente en ambos ceparios fue *Enterobacter* spp. Todas las especies identificadas de este género mostraban valores de CMI superiores a 16 mg/L y, sin embargo, ninguno de ellos portaba genes *mcr*. En este caso, a pesar de que en este género la resistencia a colistina se ha asociado también a la presencia de genes *mcr* (37), estas bacterias tienden a incrementar la expresión de los genes *prmAB*, *phoPQ* y *arn,* relacionados con cambios en la estructura del LPS, reduciendo así la afinidad de las moléculas de colistina por esta estructura (31). Esta sobreexpresión podría justificar el aumento de CMI observado en los aislados de este género, aunque, desafortunadamente, no pudo confirmarse en esta tesis doctoral.

A partir del cribado realizado para el aislamiento de bacterias resistentes a colistina, el 5,2% de las bacterias que componen el cepario COLR fueron identificadas como productoras de BLEEs (confirmado por secuenciación del genoma), porcentaje similar al observado en García *et al*. (2018) en muestras de cerdos con diarrea post-destete en España (85). Otros estudios realizados también sobre enterobacterias procedentes de cribados de muestras de origen animal para el estudio de resistencia a colistina observaron que un elevado porcentaje de estos aislados también fueron productores de BLEEs, como el de Clemente *et al*. (2019), llevado a cabo en cerdos de Portugal (180), o Sadek *et al*. (2021), en aves de corral de Egipto (181), en los que estos porcentajes se sitúan en torno al 45%. Sin embargo, son más frecuentes los estudios centrados en el cribado de muestras para la detección de aislados productores de BLEEs donde detectan, además, genes de resistencia a colistina (161, 173, 182, 183). Estos datos, aunque no son comparables debido al diferente método utilizado para la selección de aislados, denotan la existencia de una posible relación entre ambos tipos de genes de resistencia (64, 85, 181).

Atendiendo a los genes que codifican betalactamasas identificados en nuestra colección, se observó una mayor proporción de genes $bla_{CTX\text{-}M}$ en los aislados incluidos en el cepario COLR, similar a lo descrito por otros autores en estudios llevados a cabo en países europeos, donde observaron que más del 80% de las enterobacterias productoras de BLEEs procedentes de muestras de animales de abasto que analizaron, en su mayoría *E. coli*, presentaban genes $bla_{CTX\text{-}M}$ (180, 184, 185). Las enterobacterias comensales, especialmente *E. coli*, están consideradas como reservorio de BLEEs en animales (73, 74), al igual que ocurre con el gen *mcr-1*, por lo que es muy probable la coexistencia de estos genes en un mismo aislado, con el potencial riesgo de transmisión de estas bacterias a personas a través del consumo y/o manipulación de alimentos de origen animal (75). Asimismo, destacan también los aislados del género *Enterobacter* spp. obtenidos en los muestreos de cerdos llevados a cabo en esta tesis, ya que dos aislados del cepario COLR mostraron resistencia fenotípica a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y/o ceftazidima), confirmada mediante secuenciación genómica, debido a la posesión de los genes de tipo *ampC* $bla_{ACT\text{-}2}$ y $bla_{MIR\text{-}3}$. Este fenómeno las convierte en una de las bacterias patógenas nosocomiales de mayor interés en medicina humana por producir infecciones de difícil tratamiento entre los pacientes con enfermedades graves e inmunocomprometidos (186, 187). El género *Enterobacter* spp. se caracteriza por codificar en su cromosoma una betalactamasa de tipo AmpC inducible bajo la acción de determinados agentes, como cefoxitina o imipenem, pudiendo albergar en plásmidos, a su vez, genes codificantes de AmpC, como $bla_{ACT\text{-}2}$ y $bla_{MIR\text{-}3}$ (188, 189).

Sin embargo, en los dos aislados de *E. cloacae* del cepario COLR secuenciados en esta tesis, estos genes fueron identificados en el cromosoma bacteriano.

La detección en animales de enterobacterias productoras de carbapenemasas no era tan frecuente en Europa hasta la primera descripción en 2011, en Alemania, de un gen bla_{VIM-1} en aislados de *E. coli* y *S.* Infantis (190). A partir de entonces, se han identificado aislados de *E. coli* y *S. enterica* productores de carbapenemasas en muestras procedentes de animales destinados a la producción de alimentos en varios países europeos, como Italia, Austria o Rumanía (108, 191). En España, la descripción de estos microorganismos productores de carbapenemasas en animales se ha realizado en mascotas y en aves sinantrópicas (106, 192); sin embargo, no se han encontrado este tipo de genes en muestras procedentes de animales de producción. Por este motivo, destaca la resistencia a meropenem de los dos aislados de *A. hydrophila* incluidos en el cepario COLR. En ambos casos se detectó la presencia del gen *imiH* codificante de una MBL, que aparece descrito en el 30% de las secuencias cromosómicas de *Aeromonas* spp. disponibles del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), según informa la base de datos CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (158). En estos casos, al ser un gen cromosómico, su dispersión se encuentra limitada a la vía vertical; sin embargo, no deja de ser un hallazgo preocupante ya que esta especie bacteriana puede causar infecciones cutáneas en personas, así como síntomas gastrointestinales o bacteriemia, llegando a alcanzar una mortalidad del 30% (193-195).

Dentro del grupo de bacterias NCRB también se identificó otro aislado, perteneciente a la especie *E. meningoseptica,* que mostró una resistencia elevada a carbapenémicos (meropenem MIC = 16 mg/L; imipenem MIC = 16 mg/L y ertapenem MIC > 2 mg/L). Las especies de *Elizabethkingia* (género anteriormente conocido como *Chryseobacterium*) están constituidas por bacilos Gram negativos generalmente presentes en agua dulce y salada, suelo y entornos hospitalarios (196, 197). Las infecciones causadas por estos microorganismos, particularmente *E. meningoseptica*, suelen ser meningitis neonatales, aunque también se ha relacionado con neumonía y endocarditis en pacientes adultos inmunodeprimidos, con una mortalidad superior al 50% (196, 198). Así, a pesar de que los aislados NCRB no se tuvieron en cuenta para el análisis de resistencia a colistina en esta tesis, se decidió llevar a cabo la caracterización fenotípica y molecular de este aislado bacteriano, dado el potencial riesgo de transmisión a través de la cadena alimentaria por su presencia en el contenido cecal de cerdos sanos. *E. meningoseptica* mostraba elevados valores de CMI frente a otros antimicrobianos, como colistina (MIC > 16 mg/L), ceftazidima (MIC = 128 mg/L), cefotaxima (MIC = 32 mg/L), ampicilina (MIC > 64 mg/L) y gentamicina (MIC = 32 mg/L). Estos

resultados son similares a los de otros estudios, donde las especies de *Elizabethkingia* presentaron resistencia frente a polimixinas y, especialmente, β-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos por la producción cromosómica de MBL (196, 198). El análisis del resistoma llevado a cabo mediante secuenciación reveló la presencia en el cromosoma bacteriano de dos genes codificantes de carbapenemasas, $bla_{B\text{-}12}$ y $bla_{GOB\text{-}17}$, tal como se describe en otros estudios (196-198). No se identificaron plásmidos en este aislado, por lo que todos los mecanismos de resistencias a antimicrobianos restantes se encontraban también en el cromosoma bacteriano. Este aislado evidencia el hecho de que la resistencia a colistina puede concurrir con la producción de BLEEs y/o carbapenemasas en la misma bacteria. Este resultado sugiere que el uso de colistina podría favorecer de forma indirecta la selección en el intestino animal de aislados multirresistentes que, como éste, podrían haber llegado al intestino del animal de forma fortuita y, a través de la cadena alimentaria, ser transferidas a las personas, con el consecuente potencial riesgo de infección.

5.2. Localización y entorno de los genes *mcr*

Diferentes estudios que incluyen la secuenciación del genoma de enterobacterias resistentes a colistina (Hasman *et al.*, 2015; Migura-García *et al.,* 2019; García-Meniño *et al*., 2019) coinciden en señalar que los genes de la familia *mcr* se encuentran frecuentemente en estructuras plasmídicas, característica que les dota de movilidad y que constituye la principal preocupación en relación con la dispersión de estos genes de resistencia (97, 199, 200). De forma similar, los aislados bacterianos secuenciados en esta tesis (apartado 3.2.3.4.2) albergaban estos genes mayoritariamente en plásmidos de diferentes tipos, siendo IncX4, IncHI2 y ColE10 los más frecuentes.

El gen *mcr-1* ha sido frecuentemente asociado a plásmidos de tipo IncX4, principalmente en aislados de *E. coli* y *Salmonella* spp. procedentes, tanto de muestras humanas, como de animales (84, 173, 201-204). Esta situación se corresponde con lo observado en el conjunto de aislados secuenciados en esta tesis, donde *mcr-1* se localizó en este tipo de plásmido en el 40,6% de los aislados, siendo *E. coli* la especie predominante. Estos plásmidos de pequeño tamaño (30 – 50 kb) contienen principalmente genes de resistencia antimicrobianos (203).

Tradicionalmente, los determinantes de resistencia más comúnmente detectados en plásmidos IncX son *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$ (betalactamasas), *qnrS* (resistencia a quinolonas), y, en menor medida, *tet* (resistencia a tetraciclina) y *dfrA14* (resistencia a trimetoprim) (203). Desde que en 2015 se conociera la existencia de los genes *mcr*, estos plásmidos se han vinculado, además, con los genes de resistencia a colistina *mcr-1* y *mcr-2* (71, 199, 205). En los resultados obtenidos en esta tesis, el 82% de los plásmidos IncX4 solo albergaban *mcr-1*, frecuencia similar a la descrita en los estudios realizados a partir de 2015 que informan sobre la localización de estos genes de resistencia.

El entorno genético de los genes *mcr* identificados en plásmidos de tipo IncX4 contenía los genes *parA*, *pap2*, *copG* y los dominios DUF2806 y DUF2726, detectándose en el mismo orden en los 51 plásmidos IncX4 identificados. El gen *pap2* codifica una fosfatasa de fosfolípidos que, en procariotas, tiene un papel activo en la síntesis del peptidoglucano, así como en la modificación del LPS bacteriano mediante moléculas de L-Ara4N (206, 207). El gen *pap2* suele encontrarse localizado junto a los genes *mcr-1* y *mcr-3,* principalmente, y, aunque la mera presencia de la mayoría de genes *mcr* es suficiente para conferir resistencia a colistina a la bacteria, este gen parece influir en la disminución de la sensibilidad a colistina en la bacteria que porta ambos genes (pap2 y *mcr*), tal y como apuntan varios autores (206, 208). Estudios orientados a la caracterización del entorno genético de los genes *mcr*, como los llevados a cabo por Zhao *et al.* (2017) (201) y por Hadjadj *et al.* (2017) (209), señalan, además, que los genes *mcr-1* y *pap2* aparecen frecuentemente flanqueados por secuencias de inserción de tipo IS*Apl1*, a diferencia de lo observado en los plásmidos IncX4 analizados en esta tesis, donde no se encontraron este tipo de ISs. El gen *parA* codifica NTPasas de bucle P, una superfamilia de nucleósidos trifosfato hidrolasas que están involucradas en diversas funciones celulares como traducción, transcripción, replicación, reparación del ADN, transducción de señales, transporte y localización de proteínas, reconocimiento de secuencia de señales, partición cromosómica, transporte de membrana y activación de varios metabolitos (Saraste *et al*., 1990; Vetter *et al*., 1999; y Koonin *et al*., 2000, citados en Pathak *et al*., 2014 (210)). El gen *copG* tiene funciones de regulación del número de copias del plásmido (211). Aunque no se han encontrado estudios que vinculen la presencia de *parA* y *copG* con los genes *mcr*, estos genes siempre están presentes en el entorno genético del gen *mcr-1* en los plásmidos IncX4 de los aislados analizados en esta tesis. Los dominios de función desconocida (*domains of unknown function* [DUF]) DUF2806 y DUF2726 son dominios que aparecen en la base de datos Pfam sin una función descrita (212), que suelen aparecer asociados

al entorno genético del gen *mcr-1* en los aislados estudiados en esta tesis y de los que se desconoce si tienen relación directa con este gen.

Otros elementos comúnmente detectados en el entorno genético de los genes *mcr-1* identificados en los plásmidos de esta tesis fueron diversas ISs. El gen *mcr-1* ha sido asociado a la presencia de ISs (94, 173, 202, 213), lo cual facilitaría su transposición y, por tanto, aumentaría la probabilidad de dispersión de este gen de resistencia hacia otras ubicaciones genómicas. A pesar de que, como ya hemos indicado, *mcr* se asocia con mayor frecuencia a IS*Apl1* (94, 100, 201, 202, 209, 213), en el conjunto de aislados estudiados destacó por su frecuencia IS26, que fue detectada en el 73% de los plásmidos IncX4. La mayoría de los plásmidos IncX4 presentaban una unidad de IS*26* por delante de *mcr-1* y sus genes asociados, a una distancia media de 1.930 pb, mientras que en tres aislados aparecían estos genes flanqueados por dos unidades de IS*26*. Una de las principales características de esta IS es la posibilidad de movilizar regiones cercanas con una única unidad de IS*26* (94, 214). Por tanto, IS*26* podría estar jugando un importante papel en la movilización de *mcr-1* entre plásmidos y/o el cromosoma bacteriano, como ya se ha observado anteriormente en bacterias Gram negativas, como *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* o especies de *Enterobacter* spp, e incluso Gram positivas, como *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus* (94, 214). Aunque no se han realizado ensayos para estudiar la movilización de estos genes en los aislados secuenciados, la presencia de IS*26* en el entorno de *mcr-1* ha sido frecuentemente detectada en los aislados de esta tesis, por lo que la probabilidad de movilización del gen *mcr-1* en el interior celular podría verse incrementada por la presencia de estas IS.

En un plásmido IncX4 se identificó el gen *mcr-1* en un transposón Tn*3*, aunque es el gen *tet* el que se suele asociar con mayor frecuencia a estos transposones (94), coincidiendo con lo observado en otros tres plásmidos IncX4 secuenciados en esta tesis, en los que se encontró Tn*3* junto al gen *tetM*.

También se detectó IS*5* en el entorno cercano a *mcr-1 – pap2* en cinco plásmidos IncX4. Furlan *et al.* (2021) también observaron la secuencia de inserción IS*5* en el entorno genético del tándem *mcr-1-pap2* ubicado en un plásmido IncX4, sugiriendo que IS*5* también puede estar contribuyendo a la dispersión del gen *mcr-1* entre enterobacterias (215). No obstante, esta IS ya se había detectado anteriormente (Huang *et al.,* 2018) en las cercanías del gen *mcr-1.* Estos autores analizaron las regiones promotoras del gen *mcr-1* e identificaron el elemento IS*5* en un plásmido IncI2, cuya localización interrumpía la secuencia promotora del gen y disminuía significativamente la expresión de *mcr-1* (216).

El gen *mcr-1* también fue identificado con frecuencia en plásmidos de tipo IncHI2 en los aislados secuenciados en esta tesis. Estos plásmidos, a diferencia de los anteriores, eran de mayor tamaño, llegando a alcanzar un tamaño medio de 250 kb, coincidiendo con las descripciones realizadas previamente (203, 217). Caracterizados por poseer una relaxasa de tipo MOB_H, tienen un rango de hospedadores bacterianos muy amplio, incluyendo las enterobacterias, encontrándose en un número reducido de copias (203, 217, 218). Estos plásmidos han sido aislados en Europa en bacterias procedentes, tanto de personas como de animales, en numerosas ocasiones albergando genes de resistencia a antimicrobianos, siendo $bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{SHV}, bla_{IMP}, bla_{VIM}, *armA*, *qnrA1*, *qnrS1* y *qnrB2* los más frecuentes (84, 203, 217). En esta tesis, todos los plásmidos de este tipo se hallaban en aislados de *E. coli,* albergando *mcr-1.1*, excepto uno que contenía la variante *mcr-1.2*. En los plásmidos IncHI2, al igual que en los IncX4, el entorno genético de *mcr-1* contaba también en la mayoría de los casos con la presencia del gen *pap2*, tal como se ha observado en estudios realizados sobre el entorno genético de los genes *mcr* (201, 209). En el entorno de *mcr-1* se identificaron ISs en el 46% de los plásmidos IncHI2, siendo IS*Apl1* la secuencia de inserción mayoritaria en comparación a los otros elementos móviles identificados (IS*186* e IS*26*); sin embargo, en ningún caso se observó una región flanqueada por dos unidades. Wang *et al*. (2018) proponen un modelo evolutivo que trata de explicar la movilización del gen *mcr-1* mediante un transposón compuesto, de 2.600 pb aproximadamente, que incluye la estructura IS*Apl1* – *mcr-1* – *pap2* - IS*Apl1* (202). La presencia de IS*Apl1* en el entorno del *mcr-1* tiene el potencial de movilizar intracelularmente el gen *mcr-1*, incluyendo el cromosoma bacteriano (95, 219, 220). Sin embargo, en el 54% de los plásmidos IncHI2 secuenciados en esta tesis no se detectaron ISs en el entorno genético de *mcr-1*. Esta situación también se ha observado previamente en plásmidos IncHI2, sugiriendo la posibilidad de que el gen *mcr-1* haya llegado a estos plásmidos mediante la transposición mediada por la secuencia de inserción IS*Apl1* con la posterior pérdida de este elemento (200, 202). A diferencia de los plásmidos de tipo IncX4, los plásmidos IncHI2 de esta tesis portaban, además, genes de resistencia a otros antimicrobianos, los cuales se encontraban próximos entre sí formando regiones de multirresistencia, pero sin incluir a los genes *mcr*. Estas regiones incluían genes que conferían resistencia a diferentes familias de antimicrobianos, fundamentalmente aminoglucósidos, cloranfenicol, macrólidos, sulfonamidas y tetraciclinas. La presencia de múltiples genes de resistencia en este tipo de plásmidos coincide con lo descrito por Migura-García *et al*. (2019) en una selección de aislados obtenidos de muestras de cerdos con diarrea post-destete, donde los genes *mcr* aparecían con frecuencia en plásmidos junto a otros genes de resistencia a antimicrobianos, (*aac(3)-IIa*, *aadA(1,*

2), aph(3')-Ic, *str(A, B)*, *sul(1, 2), sul3*, *dfrA1, dfrA12*, *tet(A, B, C, M), cmlA*, *floR*, bla_{TEM}, $bla_{CTX\text{-}M}$) pudiendo ser transferidos junto a la estructura que los albergaba (200). Conclusiones similares se extraen de las revisiones realizadas por Rozwandowicz *et al*. (2018) y Elbediwi *et al*. (2019), las cuales recogen una mayor cantidad de datos sobre la presencia de genes de resistencia a colistina y otros antimicrobianos (trimetoprim, estreptomicina, ampicilina, amikacina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina y tetraciclina) en este tipo de plásmido (8, 203). Esta confluencia de genes de resistencia en el mismo plásmido posibilita el fenómeno de co-selección, pudiendo seleccionarse aislados bacterianos resistentes a colistina mediante el uso de otros antimicrobianos frecuentemente empleados en la producción porcina, como las tetraciclinas o los betalactámicos, incluso sin la presión selectiva de este antimicrobiano (200). Es destacable que estas regiones de multirresistencia se identificaron alejadas de la localización de los genes *mcr* en el mismo plásmido y flanqueadas por ISs en los 26 plásmidos IncHI2 secuenciados en este trabajo. Algunos de estos de genes de resistencia formaban parte de integrones tipo I, como la secuencia IntI – *aadA2* – *cmlA* – *aadA1* – *qacH* – *sul2* – *mefE,* identificada en nueve plásmidos IncHI2, u otras composiciones, como IntI – *dfrA12* – *gcuF* – *aadA2* – *cmlA1* – *aadA1* – *qacH2,* descrita por Liu *et al.* (2021) (221) y en transposones compuestos, como IS*15DI* – *aac(6')-Ib-cr* – *blaOXA–1* – *catB3* – *arr-3* – *qacEΔ1* – *sul1* – IS*26*, también observado por los mismos autores y también descritos en plásmidos IncHI2. De esta forma, la movilización de estos genes podría producirse de forma independiente a los genes *mcr-1,* si este último no se encuentra integrado en ellas, como ocurre en los aislados secuenciados en esta tesis.

Además de genes de resistencia a antimicrobianos, 25 de los 26 plásmidos IncHI2 presentaron también genes de resistencia a metales pesados, normalmente agrupados, principalmente *ter* (resistencia a telurio), *mer* (resistencia a mercurio), *pco* (resistencia a cobre), *sil* (resistencia a plata) y *cus* (resistencia conjunta a cobre y plata). Las agrupaciones de este tipo de genes han sido descritas previamente en otros estudios, como las combinaciones *sil* – *mer*, *pco* – *sil* – *mer* o *sil* – *pco* (Mourão *et al.,* 2015; Fang *et al.,* 2016) (167, 222). En las proximidades de los genes de resistencia a metales pesados de algunos de los plásmidos IncHI2 analizados en esta tesis se identificaron los genes *tnsA*, *tnsB*, *tnsC* y *tnsD* ,que componen el transposón Tn*7*, el cual se caracteriza por contar con un mecanismo de transposición de "cortar y pegar" (94, 167, 222). La proteína TnsA ejecuta las reacciones de escisión de ADN en el extremo 5', mientra que la proteína TnsB es responsable de las de rotura y unión del extremo 3' del ADN (223). Estos elementos han sido asociados con frecuencia a la transposición de los genes de resistencia *pco*, *sil* y, en ocasiones,

mer, en plásmidos de tipo IncHI2 (167, 222), por lo que, el transposón Tn*7* parece tener un papel relevante en la movilización de estos genes de resistencia entre plásmidos y el mismo cromosoma bacteriano (167, 222). Tradicionalmente, algunos metales pesados han sido utilizados en la industria porcina como aditivos para la alimentación animal, como es el caso de cobre, el cobalto o el zinc (224, 225) . Al igual que ocurre con el uso de antimicrobianos, el uso de estas sustancias puede favorecer la selección de estos genes de resistencia, lo cual otorga a las bacterias que los portan la capacidad de sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables (200).

En contraposición a los plásmidos IncX4 e IncHI2, los plásmidos ColE10 albergan el gen *mcr-4* en lugar de *mcr-1* en los aislados secuenciados. Estos plásmidos son las estructuras genómicas de menor tamaño identificadas en este estudio, con un tamaño medio de 9 kb. En todos los casos, estos plásmidos tenían *mcr-4* como único gen de resistencia, coincidiendo con lo observado por Carattoli *et al*. (2017), quienes describieron por primera vez el gen *mcr-4* en aislados de *E. coli* y *S.* Typhimurium, localizándose todos en plásmidos ColE10 (74), así como en otros estudios donde se ha detectado esta asociación entre gen y plásmido en aislados de *E. coli* procedentes de animales de abasto (97, 98). En el entorno genético de *mcr-4* se identificaron ISs en 10 de los 16 plásmidos ColE10, siendo IS*5* la más frecuente y la detectada en el entorno genético de la primera descripción del gen (74).

De forma aislada se identificaron otros tipos de plásmidos, destacando uno de tipo IncX1, por albergar el único gen de resistencia *mcr-5.1* detectado en los aislados secuenciados. Aunque este gen de resistencia ha sido descrito con mayor frecuencia en plásmidos de tipo ColE (75, 97), Guo *et al*. (2019) lo identificaron en un plásmido IncX1 en un aislado de *E. coli* obtenido a partir de una muestra de comida preparada a base de carne de pollo en un establecimiento de Singapur en 2010, siendo la primera descripción de este gen en este tipo de plásmido (226). En esta tesis el entorno genético de *mcr 5.1* (Tn*3- chrB – mcr 5.1 – mdtH*) era similar al descrito en el plásmido IncX1 (Guo *et al*., 2019) (226). Borowiak *et al*. (2017), también observaron esta misma organización en un plásmido de tipo ColE10 (75), lo que sugiere que el transposón Tn*3* podría tener un importante papel también en la movilidad del gen *mcr-5.1* entre diferentes estructuras genómicas. Otro plásmido que destaca en esta tesis es el plásmido IncHI1, identificado en un aislado de *E. coli,* ya que albergaba el gen *mcr-2.1*, escasamente descrito en Europa. A diferencia de lo observado en esta tesis, otros estudios detectan *mcr-2* en plásmidos de tipo IncX4, donde la presencia de IS*1595* cerca de este gen parece ser un elemento común (71, 227, 228). Según la información de la que se dispone actualmente, esta es la primera descripción de *mcr-2.1* en un

plásmido de tipo IncHI1. Este gen fue identificado también en otro aislado de *E. coli* incluido en esta tesis doctoral en un plásmido cuyo tipo de replicón no pudo ser determinado. Su entorno genético carecía del dominio DUF945 y presentaba la secuencia de inserción IS*1595* próxima a *mcr-2.1*, al igual que se observó en el plásmido IncHI1 ya citado, así como en la primera descripción de este gen realizada por Xavier *et al*. (2016) (71). De esta forma, se podría deducir que, independientemente del tipo de plásmido en que se encuentre el gen *mcr-2*, la secuencia de inserción IS*1595* parece jugar un papel clave en su dispersión (71, 227, 228).

Se identificó también un plásmido no movilizable de tipo IncP en otro aislado de *E. coli*, el cual era portador del gen *mcr-1.1*. Estos plásmidos se caracterizan por albergar numerosos determinantes de resistencia antimicrobiana, sobre todo genes $bla_{CTX\text{-}M}$, bla_{TEM}, bla_{OXA} , *aadA, aphA*, *sul1* y/o *tet* (203, 229, 230) y, recientemente, *mcr-1*, según lo observado por Malhotra-Kumar *et al.* (2016) (231) y Lu *et al.* (2017) (232). El plásmido IncP detectado en el conjunto de aislados secuenciados en esta tesis acumulaba genes de resistencia a diversos antimicrobianos, formando una región de multirresistencia, de la que el gen *mcr-1.1* se localizaba separado, al igual que ocurría en el resto de las estructuras plasmídicas observadas. A diferencia de lo observado en diferentes estudios (233-235), donde el gen *mcr-1* se encuentra flanqueado por dos unidades de IS*Apl1*, en el entorno genético de este gen en el plásmido IncP analizado no se observó el característico entorno genético anteriormente observado en los plásmidos IncX4 e IncHI2, ni tampoco se observaron ISs en sus inmediaciones.

Finalmente, el plásmido IncY identificado en esta tesis era una estructura de 60 kb en la que se identificó *mcr-3.2*, siendo la primera descripción en un aislado de *E. coli* procedente de una muestra de contenido cecal de ganado bovino realizada en España (Hernández *et al.*, 2017, apartado I del anexo VI). Este gen presentaba el entorno genético TnAs2 – *mcr-3.2* – *IS3* – *bleO* – IS*26,* similar al observado en la primera descripción del gen *mcr-3* en un aislado de *E. coli* procedente de un cerdo sano (73). Aunque en el estudio de Yin *et al.* (2017) el gen *mcr-3* fue identificado en un plásmido de tipo IncHI2, el entorno genético (TnAs2 – *nimC*/*nimA* – *mcr-3.2* – IS*Kpn40* – *bleO* – IS*5DI*) se asemeja al observado en esta tesis doctoral, puesto que IS*Kpn40* e IS*5DI* forman parte de las familias IS*3* e IS*6*, respectivamente, al igual que las ISs (IS*3* e IS*26*, respectivamente) detectadas en las cercanías del gen *mcr-3.2* analizado en esta tesis (236). Esto sugiere que la región en la que se encuadra el gen *mcr-3* tiene la capacidad de transponerse entre diferentes estructuras genómicas.

Desde que en 2015 se describiera por primera vez el gen *mcr-1* codificado en un plásmido las investigaciones dirigidas al estudio de la resistencia a colistina se han centrado en su localización extra-cromosómica; sin embargo, también se han observado estos genes integrados en el cromosoma bacteriano en aislados procedentes de muestras humanas (220), animales de abasto (95) y alimentos para el consumo humano (219). En esta tesis se caracterizaron 26 aislados de *E. coli* con el gen *mcr-1.1* localizado en el cromosoma, de los que 22 presentaban el tándem *mcr-1.1* – *pap2*. Otros estudios han descrito el entorno genético de genes *mcr-1* cromosómicos, el cual suele presentarse junto al gen *pap2* y dos IS de tipo IS*Apl1*, flanqueando a estos genes mostrando la disposición IS*Apl1* – *mcr-1* – *pap2* – IS*Apl1* (95, 219, 220, 237). Los aislados analizados en esta tesis presentaron en el entorno genético de *mcr-1* ISs de diferentes tipos, siendo ISL*3*, IS*21*, IS*100* las más frecuentes; sin embargo, la identificación de IS*Apl1* en plásmidos fue ocasional y en ningún caso se detectó en el cromosoma bacteriano.

La diferente localización de los genes *mcr* podría influir en la dinámica de dispersión entre distintas poblaciones bacterianas. Mientras que su localización en plásmidos conjugativos aumenta su potencial dispersión por transferencia horizontal, la localización en el cromosoma sólo permite su dispersión clonal. Además, según Shen *et al.* (2020), la presencia de genes *mcr* en el cromosoma podría estar relacionado con fenómenos de transformación tras la intervención de fagos lisogénicos. Estos autores observaron la existencia de regiones de ADN cercanas al gen *mcr-1* similares a fagos, que habrían perdido sus componentes lisogénicos, y que podrían asociarse con la estabilización de estos genes en el cromosoma bacteriano (96).

Incluyendo la variable temporal en este análisis se pudo observar que, con el tiempo, la localización de los genes *mcr* variaba de una estructura a otra. En esta tesis, la detección más temprana de genes *mcr* se remonta al año 2003, concretamente la variante *mcr-4.3.* No fue hasta el año 2006 cuando se identificó el primer gen *mcr-1.1* en dos aislados de *E. coli*, localizado en un plásmido IncX4 e IncHI2, respectivamente. Aguirre *et al.* (2020) describen una situación similar en un estudio realizado sobre una selección de aislados de *E. coli* obtenidos entre 1999 y 2014 procedentes de animales en España, identificando el gen *mcr-4* en aislados de 2001, mientras que las primeras bacterias portadoras de *mcr-1* datan de 2005 (160).

La proporción entre *mcr-1* y *mcr-4* se mantuvo en valores similares hasta 2008, año a partir del cual *mcr-1* comienza a ser predominante. Todos los genes *mcr-4* se identificaron en plásmidos no conjugativos movilizables de tipo ColE10, mientras que los *mcr-1* se localizaron en plásmidos conjugativos, mayoritariamente de tipo IncX4 e IncHI2, que al contar con los mecanismos

necesarios para llevar a cabo el proceso de conjugación por sí mismos, habría aumentado la capacidad de dispersión del gen *mcr-1*, sugiriendo así, que el tipo de plásmido en que se localizaban estos genes podría ser un factor determinante para su dispersión. Esta hipótesis la analizaron Gallardo *et al.* (2021) (238), estudiando las eficiencias de conjugación de 74 aislados de *E. coli* resistentes a colistina todos de esta tesis, de los cuales 69 albergaban el gen *mcr-1* en plásmidos IncX4, IncHI2 e IncI2; y dos el gen *mcr-4* en plásmidos ColE10, observándose una mayor eficiencia de conjugación en los plásmidos IncX4 que en los plásmidos IncHI2. Los plásmidos IncI2 y ColE10 no fueron transferidos mediante conjugación, confirmando que, efectivamente, carecían de la maquinaria completa para llevar a cabo este proceso, por lo que el tipo de estructura genómica donde se integran los genes *mcr* juega un papel clave en su posible dispersión.

Aunque la selección de aislados secuenciados no es aleatoria, teniendo en cuenta la localización genómica de los genes *mcr* a lo largo de los años estudiados (2003 hasta 2021) se pudieron observar variaciones en la ubicación de estos genes. Entre los años 2006 y 2017, el gen *mcr-1* se localizaba principalmente en plásmidos de tipo IncX4, estructuras de pequeño tamaño, en su mayoría conjugativos, en los que, salvo excepciones, no se observaban otros genes de resistencia a antimicrobianos. La proporción de genes *mcr-1* localizados en plásmidos IncHI2 comenzó a aumentar a partir del año 2012, hasta alcanzar su máximo en 2018, año en que la proporción de plásmidos IncX4 comenzó a disminuir, como también señalan Shen *et al*. (2020). Estos autores detectaron un aumento en el número de plásmidos IncP e IncHI2 que albergaban el gen *mcr-1* tras la prohibición del uso de colistina en animales impuesta en China en el año 2017 (239). En ambos casos, se trata de plásmidos más grandes, en su mayoría conjugativos, que albergaban habitualmente regiones de multirresistencia, tanto a antimicrobianos como a metales pesados, además de los genes *mcr*, lo cual les podría permitir evadir la acción de otros antimicrobianos y desinfectantes pudiendo facilitar, además, su co-selección (107, 167, 200, 225, 240). Sin embargo, entre los años 2018 y 2019 tuvo lugar un punto de inflexión en la localización intracelular de los genes *mcr*, puesto que el número de aislados portadores de *mcr* cromosómico alcanzó proporciones similares al número de bacterias que albergaban estos genes en plásmidos. Esta progresión ascendente, que comenzó en 2017, continuó hasta 2021, cuando la proporción de *mcr* integrados en el cromosoma bacteriano superaba a las localizaciones plasmídicas. A pesar de que su localización cromosómica podría disminuir el potencial de dispersión, por contra, parece aumentar su estabilidad en la bacteria y garantizar de esta forma su transferencia a cada una de

las células resultantes de la división celular (96), lo cual explicaría la distribución encontrada en los aislados de este trabajo.

5.3. Efectos de la congelación de muestras

El proceso de congelación de muestras biológicas, así como la duración y la temperatura del almacenamiento una vez congeladas, pueden afectar drásticamente a la supervivencia bacteriana (241). La disminución del número de muestras con crecimiento bacteriano observada en esta tesis tras el periodo de congelación muestra una gran similitud con los datos de viabilidad celular obtenidos en el estudio de Phalakornkule *et al.* (2017), quienes estudiaron los efectos que la congelación puede causar sobre la viabilidad celular y actividad microbiana en muestras de lodo, observando una disminución de al menos el 74% en la supervivencia bacteriana tras haber sufrido un proceso de congelación (241). Lautenbach *et al*. (2008) comprobaron también cómo, tras congelar hisopos de muestras peri-rectales de pacientes de un hospital de Pensilvania (EE.UU), la cantidad de aislados que crecían en el medio de cultivo disminuyó. A diferencia de lo observado en esta tesis, en el trabajo de Lautenbach *et al*. se observó un menor descenso en el número de muestras positivas. No obstante, en este caso, el periodo de congelación que utilizaron (tres meses) fue inferior al de esta tesis (seis meses) (242), lo cual sugiere que la duración del proceso de congelación puede llegar a tener efecto sobre la viabilidad bacteriana, tal y como se ha descrito anteriormente.

En esta tesis, la viabilidad y la diversidad de géneros bacterianos recuperados se vieron afectadas tras el proceso de congelación, ya que tanto la cantidad de muestras con crecimiento de aislados resistentes a colistina como los índices de diversidad de muestras frescas y congeladas, mostraron diferencias significativas, sugiriendo que este proceso no afectaría de la misma forma a los diferentes géneros bacterianos. Este hecho ya había sido observado previamente por Dorsaz *et al.* (2020) (243), quienes, mediante análisis metagenómicos, estudiaron las poblaciones bacterianas de muestras de heces antes y después de distintos tiempos de congelación, observando una relación inversamente proporcional entre tiempo de congelación y diversidad bacteriana. Dado que el almacenamiento a temperaturas de congelación disminuye significativamente la viabilidad celular de las poblaciones microbianas presentes en la muestra, su posterior uso para estudios fenotípicos que impliquen la obtención de aislado bacterianos

mediante procedimientos tradicionales basados en el uso de medios de cultivo, podría suponer un problema.

A diferencia de lo que ocurría con las células bacterianas, los resultados de qPCR mostraron que el proceso de congelación/descongelación no influía de forma significativa en la cantidad de ADN bacteriano detectado en la muestra. Las moléculas de ADN permanecen estables durante la congelación, tal como se ha observado en estudios llevados a cabo con ADN bacteriano de materia fecal congelada (243, 244). Estos autores han comprobado, mediante técnicas moleculares para el estudio del ADN, empleando en ambos trabajos, tanto qPCR como secuenciación masiva para la detección de las regiones V3 y V4 del rARN 16s, que la composición de las poblaciones se mantenía relativamente invariable tras el proceso de congelación. Sin embargo, esta estabilidad también se ha relacionado con las condiciones de congelación aplicadas, las cuales pueden llegar a suponer un factor importante a tener en cuenta para la óptima conservación del ADN bacteriano (243-245).

En esta tesis (figura 9, apartado 4.2.2) no se apreciaron variaciones significativas en la cuantificación del gen *mcr-1* en muestras frescas y congeladas, resultados que se encuentran en sintonía con lo observado en los estudios de Phalakornkule *et al*. (2017) (241), Bassis *et al*. (2017) (244) y Dorsaz *et al.* (2020) (243), que también analizaron ADN bacteriano empleando técnicas de secuenciación genómica y PCR antes y después de diferentes periodos de congelación de muestras de lodo, hisopos rectales y heces, respectivamente. Estos estudios coinciden en resaltar la estabilidad del ADN en las muestras tras haber sido congeladas, comparando los resultados con los obtenidos tras el procesamiento en fresco de las mismas (241, 243, 244). Los resultados del estudio llevado a cabo en esta tesis evidenciaron que la técnica de qPCR era más adecuada que el cultivo bacteriano para el estudio de retrospectivo del gen de resistencia a colistina *mcr-1* en muestras congeladas. De esta forma, se optó por el uso de la técnica de qPCR para el estudio del gen *mcr-1* en las muestras recogidas en diferentes periodos temporales, ya que posibilitaba la realización de estudios retrospectivos, comparando los datos obtenidos a lo largo del tiempo.

Por otra parte, los resultados de qPCR podrían estar sobreestimado la cantidad de células bacterianas viables presentes en las muestras de contenido, puesto que el ADN detectado incluye también el procedente de células muertas (243). Por tanto, los métodos de cultivo bacteriano y de detección de ADN son complementarios para evaluar la resistencia a colistina, especialmente en muestras congeladas.

5.4. Resistencia a colistina asociada a genes *mcr* y su relación con las ventas de polimixinas en España

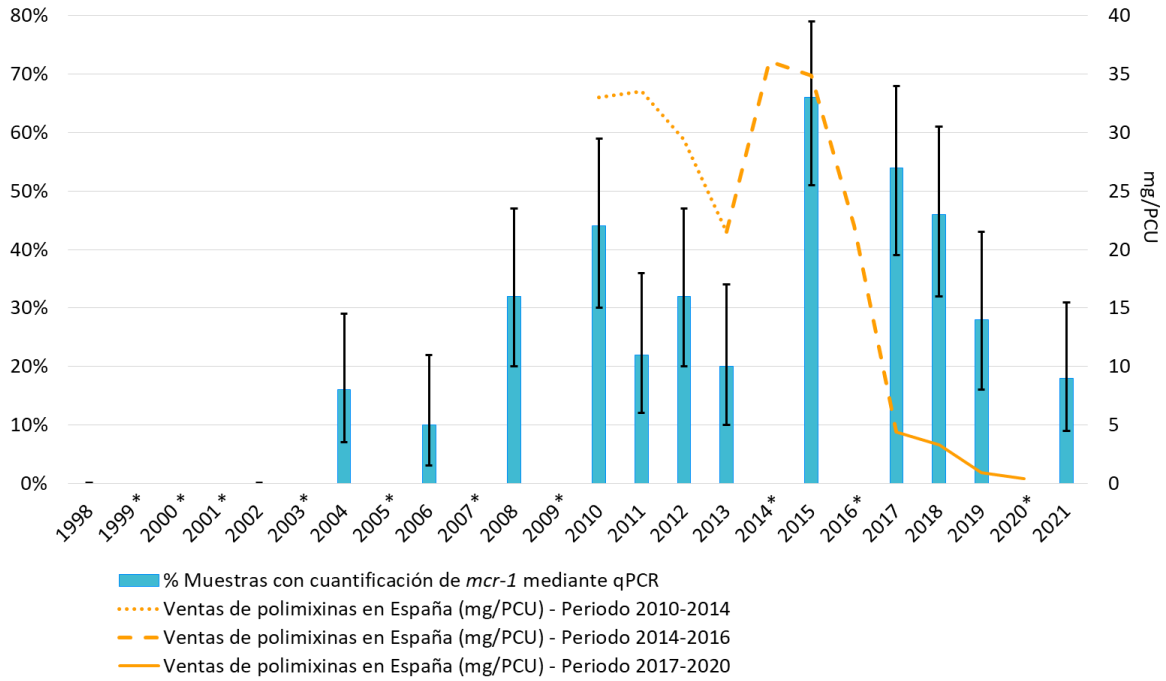
El ZnO es un micronutriente esencial necesario para diversas funciones celulares, aprobado como aditivo para alimentación animal en la Unión Europea desde 1970 (246). La primera detección de *mcr-1* en muestras de contenido cecal de cerdos en esta tesis (2004) coincidió en el tiempo con la limitación en España del uso de óxido de zinc (ZnO) como aditivo en la alimentación de lechones (2003 - 2004). En 2003 el *Scientific Committee on Animal Nutrition* (SCAN) de la UE recomendó una reducción de los niveles de ZnO en los aditivos para alimentación animal, ya que se solía encontrar en cantidades mayores a las necesarias para suplementar los requisitos fisiológicos de los animales (247). Esta recomendación fue recogida por el Reglamento (CE) Nº 1334/2003 de la Comisión de 25 de julio de 2003 (248), donde, considerando que los beneficios que aportaba el uso de este compuesto eran inferiores a los riesgos que suponían para el medioambiente, se reguló su uso y se pusieron límites de dosificación y de tiempo durante el cual se podía administrar ZnO a los animales, a fin de reducir los niveles y adaptarlos a los requisitos fisiológicos de los animales. De esta forma, el uso de zinc (en cualquier formulación) se limitó a una concentración de 150 mg/día en animales de abasto (anexo del Reglamento (CE) Nº 1334/2003 (248)), cantidad que resultaba insuficiente para emplearlo con fines terapéuticos. Como alternativa al uso de ZnO, se utilizaron antimicrobianos como solución a corto plazo para tratar las diarreas post-destete en lechones, destacando la colistina como sustancia más empleada para tal fin, debido al bajo potencial de selección de bacterias resistentes que inicialmente se pensaba que poseía este antimicrobiano, generalizando su uso con el paso de los años, tal como se describe en un informe de ANPROGAPOR de 2017 (249).

Analizando el periodo comprendido entre 2004 y 2010, en el cepario COLR se observó un aumento en el número de muestras con presencia de *mcr-1* que podría estar relacionado con el uso generalizado que se hizo de la colistina a partir de dicho periodo. En el periodo 2011 – 2013 se observó una disminución en el porcentaje de muestras *mcr-1* positivas comparado con el del año 2010, coincidiendo con una reducción de la producción de lechones en España (250). No obstante, el descenso de ventas de polimixinas en animales podría también estar relacionado con el cambio en el sistema de recolección de datos nacionales, más que con las variaciones observadas en las ventas. Dado que la AEMPS detectó una disminución en la notificación de las ventas de polimixinas en el periodo 2010 – 2013, que indicaba que los datos de este periodo podrían estar subestimados,

y que en 2017 se pasó de recoger los datos declarados por los titulares de los derechos de comercialización a recogerlos también de minoristas como proveedores de datos de ventas para el período 2017 – 2020, resulta complicado analizar las tendencias de los periodos 2010–2014, 2014–2016 y 2017–2020 de forma conjunta (163). Por ello, se decidió que lo más correcto era analizar estos periodos de forma separada, tal y como se refleja en la figura 26.

Tras este periodo (a partir de 2013), se detectó un aumento significativo de muestras positivas a *mcr-1* en el año 2015 (el año con mayor número de muestras positivas del estudio). Es interesante destacar que según los datos aportados por ESVAC, España presentaba en 2015 el mayor número de ventas de polimixinas de la UE (34,9 mg/PCU) (41); sin embargo, este año supuso un punto de inflexión en cuanto a la progresión del gen de resistencia *mcr-1*. Tras la publicación de unas recomendaciones propuestas por la EMA para reducir el uso de colistina en animales, y la aplicación en España de los programas de carácter voluntario promovidos por la AEMPS para reducir el uso de este antimicrobiano en las diferentes especies animales que integran la industria alimentaria, como es el caso del cerdo (251), las ventas de polimixinas en España cayeron desde 22,02 mg/PCU en 2016 hasta 4,4 mg/PCU en 2017, continuando con esta disminución en 2018 (3,3 mg/PCU), 2019 (0,9 mg/PCU) y 2020 (0,4 mg/PCU). Estos datos indicaban que España había cumplido el objetivo marcado por la EMA de reducir su consumo de polimixinas por debajo de 5 mg/PCU en un periodo de 3 a 4 años contados desde 2016 (3, 41, 122). El descenso de ventas se reflejó en los porcentajes de muestras con presencia de *mcr-1*, los cuales mostraron una tendencia descendente desde 2017 hasta 2021, llegando a alcanzar niveles de resistencia por debajo de los obtenidos en 2008. Según el informe JIACRA III (252) esta relación se ha observado en otros países de la UE como Italia (253) y Alemania (254), donde también se implementaron estrategias para limitar el uso de colistina obteniendo un descenso paralelo de los niveles de resistencia a colistina y del uso del antimicrobiano en animales, especialmente en cerdos y aves de corral, mostrando una asociación estadísticamente significativa. Fuera del continente europeo también se ha observado esta asociación en China (Wang *et al*., 2020) (255). Por tanto, el estudio longitudinal llevado a cabo con muestras de ganado porcino en esta tesis sugiere que la resistencia a colistina asociada al gen *mcr-1* está relacionada con las ventas de polimixinas, como también han señalado otros estudios (253, 255, 256) y autoridades (108, 251, 252) (figura 26).

Figura 26. Evolución conjunta del porcentaje de muestras positivas mediante qPCR al gen *mcr-1* y de las ventas de polimixinas para uso veterinario en España.



*Muestras no disponibles en los años 1999, 2000, 2001, 2003, 2005, 2007, 2009, 2014, 2016 y 2020; Las líneas negras verticales indican el intervalo de confianza al 95% de los resultados de qPCR para la cuantificación del gen *mcr-1*; Los datos de ventas de polimixinas en animales estaban disponibles a partir de 2010 y hasta 2020 (último año con informe de ventas publicado por ESVAC). Estos datos se representan en tres periodos diferentes, cada uno de ellos siguiendo un mismo sistema de recogida de datos, tal como se especifica en el informe ESVAC para España; PCU: *population correction unit*. Figura de elaboración propia.

La disminución de los niveles de resistencia a colistina asociada a la presencia del gen *mcr-1* en ganado porcino descrita en esta tesis no se produjo de forma tan rápida como la de las ventas del antimicrobiano (figura 26), reflejando la idea ya conocida de que la supresión del uso de un antibiótico no se traduce necesariamente en la reducción de los niveles de resistencia. Entre los factores implicados en el mantenimiento de las bacterias resistentes al disminuir la presión selectiva está probablemente el cambio en la localización del gen, ya indicado anteriormente. Los resultados del análisis de las secuencias genómicas evidencian que, a partir del año 2018, la proporción de genes *mcr* en plásmidos conjugativos comenzaba a descender, mientras la localización cromosómica de estos genes aumentaba, así como también lo hacía su presencia en plásmidos no conjugativos. El incremento en la localización cromosómica de *mcr-1* le permitiría

mantenerse en la población bacteriana, aún habiéndose reducido la presión selectiva debida al uso de colistina, impidiendo su total desaparición. La mayor estabilidad que muestran los genes *mcr* al integrarse en el cromosoma estaría facilitando su mantenimiento en las bacterias portadoras, tal como sugieren Sun *et al*. (2018) (237), y podría explicar el aumento observado de la localización cromosómica de estos genes tras la recomendación de reducción del uso de colistina en animales propuesta por la EMA (3), situación que podría comprometer el éxito de las estrategias diseñadas para combatir la resistencia a colistina. Además, la presencia de genes *mcr* en plásmidos grandes, que albergan otros genes de resistencia, facilita su co-selección tras el uso de cualquiera de ellos (200). Así, la diferente localización genómica de los genes *mcr* podría haber desempeñado un papel determinante en su dispersión y abundancia (100, 200, 257). Por tanto, el desarrollo de planes de vigilancia epidemiológica de bacterias multirresistentes resulta cada vez más necesario para poner freno al progresivo aumento de este tipo de microorganismos, estrategias que deben acompañarse de un uso prudente de los antimicrobianos para evitar o reducir la aparición de nuevos determinantes de resistencia que compliquen los tratamientos disponibles en la actualidad.

Este periodo de aumento exponencial de la resistencia a colistina ha fomentado la implementación de mejoras en el sector ganadero, como modificaciones en el manejo de los animales mediante el incremento de la edad a la que se produce el destete de los lechones (de 28 a 36 ó 42 días), observándose una disminución de la prevalencia y gravedad de la diarrea post-destete (249); así como avances en la bioseguridad de las explotaciones. De esta forma, el sector porcino se encuentra en mejor situación que en 2003 para afrontar los cambios en la legislación, como la prohibición del uso de ZnO, aprobada en 2017 (258), y que ha entrado en vigor en junio de 2022. La supresión del uso de ZnO como medicamento para el control de la diarrea post destete en lechones parece que tendrá una menor repercusión en el sector, sin necesidad de recurrir al uso de antimicrobianos (especialmente colistina) como alternativa a esta sustancia, evitando el desarrollo y dispersión de bacterias resistentes.

5.5. Estudio experimental de la capacidad de diseminación de aislados resistentes a colistina portadores del *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina

Se considera que los procesos de transferencia horizontal de genes juegan un papel crítico en la dispersión intestinal del gen *mcr-1* (256, 259) y, mediante este ensayo *in vivo*, se trató de comprobar qué influencia podría ejercer la administración de colistina sobre este fenómeno tras haber introducido artificialmente una cepa de *S.* Typhimurium portadora de este gen en el intestino de pollos. Se utilizó esta especie bacteriana debido a que los pollos neonatos son altamente susceptibles a la colonización por *Salmonella* (260), además de ser fácilmente identificable en estos animales puesto que no forma parte de su microbiota comensal (261). A pesar de que los resultados de esta tesis doctoral estaban centrados en bacterias procedentes de ganado porcino, se emplearon pollos como modelo animal, ya que su tamaño facilitaba su manejo y permitía aumentar el número de animales incluidos en la experiencia y, por tanto, la precisión del ensayo.

El posible efecto que un tratamiento con colistina puede tener sobre la dispersión de la resistencia se estudió mediante la administración del antimicrobiano durante 7 días, tal como recomendaba la EMA para el tratamiento de infecciones entéricas causadas por *E. coli* susceptible no invasiva (3), empleando como indicador el gen *mcr-1*. Este mismo efecto ha sido descrito por otros autores que ya especulaban con la posible relación causa-efecto establecida entre el uso de colistina y el aumento en la dispersión de genes *mcr* (30, 67). Este estudio puso de manifiesto el impacto en la propagación de la resistencia a colistina de la presencia de bacterias portadoras del gen *mcr-1* en la microbiota intestinal, especialmente cuando se aplica colistina al mismo tiempo, demostrando que la presencia de una cepa portadora del gen de resistencia en el intestino es más decisiva en la dispersión del gen que el efecto selectivo del antibiótico, hecho ya sugerido por Ahmed *et al*. (2021), quienes llevaron a cabo un estudio de cohortes con lechones lactantes para estudiar el efecto de un tratamiento con colistina en la selección de cepas de *E. coli* resistentes (262).

El hecho de albergar genes *mcr* en un entorno libre de colistina normalmente conlleva un coste fisiológico para la bacteria portadora asociado a la trascripción-traducción de un gen que no es necesario, situándolas en desventaja biológica frente a las bacterias que no los presentan (178, 263). A pesar de que no todos los mecanismos de resistencia a colistina conllevan un aumento del coste fisiológico, se ha observado que el gen *mcr-1* sí parece tenerlo en ausencia de colistina, lo

que terminaría desembocando en la selección de bacterias que carecen de este gen a lo largo de las sucesivas generaciones bacterianas. No obstante, este coste puede ser contrarrestado por la aparición de mutaciones compensatorias en los plásmidos o en el propio cromosoma (263) o por presencia de genes accesorios (genes de resistencia a antibióticos y/o a metales pesados, factores de virulencia o genes que aporten nuevas funciones metabólicas) que resultan beneficiosos para la supervivencia de la bacteria y que permiten el mantenimiento del plásmido en que se localiza el gen, en lo que se conoce como la paradoja del plásmido de Harrison y Brockhurst (263, 264). El coste fisiológico puede explicar la menor cuantificación de *Salmonella* spp. en el grupo G3 (pollos expuestos a *S*. Typhimurium) en comparación con el G4 (pollos con administración de colistina y expuestos a *S*. Typhimurium), ya que en este último grupo la cepa de *Salmonella* spp. podría haber aprovechado la ventaja selectiva proporcionada por el uso de colistina.

Los resultados del grupo G4 apoyan la hipótesis inicial del efecto de potenciación que ejerce la administración de colistina en la propagación de las bacterias resistentes a este antibiótico debido a la presencia de genes *mcr*. Además, estos datos evidencian la elevada capacidad de dispersión del gen *mcr-1* entre las bacterias portadoras en el tracto intestinal de los animales, especialmente en presencia de colistina, de igual forma que se concluye en las revisiones de Poirel *et al*. (2017) y Sun *et al.* (2018) a partir de los estudios que recogen sobre la resistencia a colistina asociada a los genes *mcr* (30, 31). Los niveles de *mcr-1* observados en el grupo G4 comenzaron a disminuir tras la retirada del antibiótico, pero a un ritmo más lento que los niveles de *Salmonella* spp., llegando a alcanzar unos valores similares a los del grupo G3 (figura 25B). Este resultado sugiere que la reducción observada podría estar asociada al gen *mcr-1* albergado en cepas de *Salmonella* spp. y que la cantidad de *mcr-1* final cuantificada en el día 21 podría proceder, principalmente, de otras especies bacterianas presentes en la microbiota intestinal, que habrían sido probablemente seleccionadas por la presión selectiva asociada al uso de la colistina. Este mismo efecto ha sido comentado en revisiones sobre el uso de colistina en animales (20, 30, 67) y descrito incluso en estudios llevados a cabo en medicina humana como el de Samonis *et al*. (2014) (56) en enterobacterias aisladas en pacientes de un hospital en Grecia, o el de Gagliotti *et al.* (2021) (253), que analizaron aislados procedentes del sistema de vigilancia de cepas de enterobacterias portadoras de *mcr* Micro-RER, en los que ya se sugirió la posible relación causa-efecto establecida entre el uso de colistina y el aumento en la detección de genes *mcr.*

La vía más empleada para la administración de colistina ha sido la oral en agua de bebida o mediante la suplementación del pienso (3, 265). Sin embargo, esta vía de administración conlleva

supeditar la dosis de colistina realmente administrada a cada animal a la cantidad de agua o pienso ingerida, por lo que, en algunos casos, la concentración de antibiótico alcanzada en el organismo podría ser inferior a la esperada y estaría creando un entorno favorable para la selección de bacterias resistentes al mismo (22, 43, 266). Así, el uso de colistina ha jugado un papel significativo en la proliferación de bacterias portadoras del gen *mcr-1* en la microbiota de los animales, siendo su efecto mayor cuando estas bacterias fueron introducidas en el intestino en presencia de colistina, en cuyo caso la resistencia asociada a este gen parecía aumentar su dispersión.

6. CONCLUSIONES

1. La mayoría de enterobacterias resistentes a colistina fueron multirresistentes.

2. El gen de resistencia a colistina detectado con mayor frecuencia en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en animales de abasto fue *mcr-1.*

3. Los plásmidos que con mayor frecuencia albergan el gen *mcr-1* son los plásmidos conjugativos IncX4 e IncHI2. En ambos casos, *mcr-1* se encuentra unido al gen *pap2* también implicado en la resistencia a colistina.

4. El gen *mcr-1* en los plásmidos IncX4 e IncHI2 se localiza siempre en zonas distantes de regiones de acumulación de resistencias a otros antimicrobianos.

5. El número de copias de *mcr-1* por gramo de contenido cecal de ganado porcino mostró una tendencia descendente a partir del año 2016, año en el que se puso en marcha la estrategia para la reducción del uso de colistina en animales. Este hecho pone de manifiesto una estrecha vinculación entre ventas de polimixinas y resistencia de colistina asociada a *mcr-1* en ganado porcino en España.

6. El gen *mcr-4* se ha detectado únicamente en plásmidos no movilizables de tipo ColE10.

7. Entre 2003 y 2017, los genes *mcr-1* aparecían localizados en plásmidos conjugativos de distinto tamaño que permitían su transmisión horizontal. En cambio, a partir de 2017 la frecuencia de localización cromosómica de estos genes se ve incrementada.

8. La presencia de bacterias portadoras de *mcr-1* es más decisiva que la sola administración de colistina en la persistencia del gen en bacterias comensales del intestino.

9. El uso de la técnica qPCR a tiempo real para cuantificar el nivel de resistencia a colistina asociada a *mcr-1* en heces de ganado porcino ha demostrado ser muy eficaz para realizar estudios retrospectivos en colecciones de heces congeladas, dado que no resulta afectada por la disminución de viabilidad de la población bacteriana.

7. CONCLUSIONS

1. Most of colistin resistant *Enterobacteriaceae* were multi-drug resistant bacteria.

2. The most frequently detected colistin resistance gene in *Enterobacteriaceae* from food-producing animals was *mcr-1*.

3. The plasmids most frequently harbouring the *mcr-1* gene are the IncX4 and IncHI2 conjugative plasmids. In both cases, *mcr-1* is linked to the *pap2* gene, also involved in colistin resistance.

4. The location of the *mcr-1* gene on plasmids IncX4 and IncHI2 is always distant from other regions with accumulation of AMR genes.

5. The number of *mcr-1* copies per gram of pig caecal content showed a downward trend since 2016, when the strategies for reduction in the use of colistin in animals were implemented. This fact highlights the close link between polymyxin sales and *mcr-1* associated colistin resistance in pigs in Spain.

6. The *mcr-4* gene was exclusively detected in non-mobilizable ColE10 plasmids.

7. In isolates recovered between 2003 and 2017, *mcr-1* genes were located in conjugative plasmids of different sizes that allowed their horizontal transmission. However, since 2017, these genes were more frequently found in chromosomal locations.
8. The presence of *mcr-1*-carrying bacteria is more decisive than colistin administration alone in the persistence of the gene in the gut commensal bacteria.

9. The use of real-time qPCR to quantify the level of *mcr-1*-associated colistin resistance in pig caecal contents has demonstrated to be very effective for retrospective studies on frozen faecal collections, as the results are not affected by the decrease in viability of the bacterial population.

8. REFERENCIAS

1. Hall TJ, Villapún VM, Addison O, Webber MA, Lowther M, Louth SET, Mountcastle SE, Brunet MY, Cox SC: A call for action to the biomaterial community to tackle antimicrobial resistance. *Biomaterials Science.* 2020, 8:4951-4974.

2. Munita JM, Arias CA: Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016, 4:4.2.15.

3. European Medicines Agency. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. EMA/231573/2016. 2016. Actualizado el 27 de julio de 2016. [Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en-0.pdf.] Fecha último acceso: 23/03/2023.

4. Serna C, Gonzalez-Zorn B: Antimicrobial resistance and One Health. *Rev Esp Quimioter.* 2022, 35 Suppl 3:37-40.

5. González-Zorn B, Escudero JA: Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int Microbiol.* 2012, 15:101-109.

6. O'Neill J: *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*: Government of the United Kingdom; 2016.

7. Hu Y, Yang X, Qin J, Lu N, Cheng G, Wu N, Pan Y, Li J, Zhu L, Wang X, et al.: Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Communications.* 2013, 4:2151.

8. Elbediwi M, Li Y, Paudyal N, Pan H, Li X, Xie S, Rajkovic A, Feng Y, Fang W, C. Rankin S, et al.: Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980–2018). *Microorganisms.* 2019, 7:461.

9. Barnett M, Bushby SR, Wilkinson S: SODIUM SULPHOMETHYL DERIVATIVES OF POLYMYXINS. *Br J Pharmacol Chemother.* 1964, 23:552-574.

10. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD: Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 2005, 40:1333-1341.

11. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J: Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008, 21:449-465.

12. Antonic V, Stojadinovic A, Zhang B, Izadjoo MJ, Alavi M: Pseudomonas aeruginosa induces pigment production and enhances virulence in a white phenotypic variant of Staphylococcus aureus. *Infect Drug Resist.* 2013, 6:175-186.

13. Mlynarcik P, Kolar M: Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of mcr genes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2019, 163:28-38.

14. Abachin E, Poyart C, Pellegrini E, Milohanic E, Fiedler F, Berche P, Trieu-Cuot P: Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of Listeria monocytogenes. *Mol Microbiol.* 2002, 43:1-14.

15. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL: Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2006, 6:589-601.

16. Nation RL, Li J: Colistin in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 2009, 22:535-543.

17. Koyama Y, Kurosasa A, Tsuchiya A, Takakuta K: A new antibiotic 'colistin' produced by spore-forming soil bacteria. *J Antibiot.* 1950, 3:457-458.

18. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K: Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005, 25:11-25.

19. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K: Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2004, 53:837-840.

20. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Lopez Navas A, Mackay D, et al.: Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents.* 2015, 46:297-306.

21. Halaby T, Al Naiemi N, Kluytmans J, van der Palen J, Vandenbroucke-Grauls CM: Emergence of colistin resistance in Enterobacteriaceae after the introduction of selective digestive tract

decontamination in an intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57:3224-3229.

22. Catry B, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, de Kruif A: Antimicrobial resistance in livestock. *J Vet Pharmacol Ther*. 2003, 26:81-93.

23. Conway SP, Pond MN, Watson A, Etherington C, Robey HL, Goldman MH: Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 1997, 52:987-993.

24. Tascini C, Ferranti S, Messina F, Menichetti F: In vitro and in vivo synergistic activity of colistin, rifampin, and amikacin against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Clin Microbiol Infect.* 2000, 6:690-691.

25. Giamarellos-Bourboulis EJ, Karnesis L, Giamarellou H: Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2002, 44:259-263.

26. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK: Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates.* 2010, 13:132-138.

27. World Health Organization (WHO), Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use: report of a WHO working group consultation, 15–18 February 2005, Canberra, Australia. 2005. [Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43330/9241593601_eng.pdf]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

28. World Health Organization (WHO). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: 4th Revision. 2013. [Disponible en: https://www.who.int/publications/i/item/9789241511469]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

29. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H: Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion.* 2015, 31:707-721.

30. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y: Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 2018, 26:794-808.

31. Poirel L, Jayol A, Nordmann P: Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017, 30:557-596.

32. Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL: *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews.* 2005, 6:17-39.

33. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A: Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2017, 59:31.

34. Vandekerchove D, De Herdt P, Laevens H, Pasmans F: Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathology.* 2004, 33:117-125.

35. Roy P, Purushothaman V, Koteeswaran A, Dhillon AS: Isolation, Characterization, and Antimicrobial Drug Resistance Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Japanese Quail and their Environment. *Journal of Applied Poultry Research.* 2006, 15:442-446.

36. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, Madec J-Y, Jouy E: What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2013, 42:379-383.

37. El-Sayed Ahmed MAE-G, Zhong L-L, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian G-B: Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections.* 2020, 9:868-885.

38. Schröder G, Lanka E: The mating pair formation system of conjugative plasmids—A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid.* 2005, 54:1-25.

39. Maron DF, Smith TJS, Nachman KE: Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health.* 2013, 9:48.

40. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Medicamentos veterinarios que contienen colistina para administración oral. Información para los laboratorios titulares. Edited by: AEMPS; 2015.

41. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC). Interactive ESVAC database. [Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac#interactive-esvac-database-section]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

42. Friedlander LG, Arnold D: Colistin. 2006. [Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/2-2006-colistin.pdf]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

43. Kumar H, Chen BH, Kuca K, Nepovimova E, Kaushal A, Nagraik R, Bhatia SK, Dhanjal DS, Kumar V, Kumar A, et al.: Understanding of Colistin Usage in Food Animals and Available Detection Techniques: A Review. *Animals (Basel).* 2020, 10.

44. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). CIMAVET medicamentos veterinarios. [Disponible en: https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

45. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M: Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection.* 2012, 18:18-29.

46. Deane J, Rea MC, Fouhy F, Stanton C, Ross RP, Plant BJ: Chapter 11 - Long-Term Implications of Antibiotic Use on Gut Health and Microbiota in Populations Including Patients With Cystic Fibrosis. In *The Gut-Brain Axis*. Edited by Hyland N, Stanton C: Academic Press; 2016:223-259.

47. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary medicines and inspections, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, UK (2002). [Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500012961.pdf]

48. Katz E, Demain AL: The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev.* 1977, 41:449-474.

49. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clinical Pharmacokinetics.* 2017, 56:1441-1460.

50. Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K: In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45:781-785.

51. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J: Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013, 8:711-724.

52. Raetz CR, Whitfield C: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002, 71:635-700.

53. Frirdich E, Whitfield C: Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. *J Endotoxin Res.* 2005, 11:133-144.

54. Newton BA: The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriol Rev.* 1956, 20:14-27.

55. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M: Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology.* 2014, 5:643-643.

56. Samonis G, Korbila IP, Maraki S, Michailidou I, Vardakas KZ, Kofteridis D, Dimopoulou D, Gkogkozotou VK, Falagas ME: Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin *Enterobacteriaceae* and association with colistin use in a tertiary hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2014, 33:1505-1510.

57. Merkier AK, Rodríguez MC, Togneri A, Brengi S, Osuna C, Pichel M, Cassini MH, Centrón D: Outbreak of a Cluster with Epidemic Behavior Due to *Serratia marcescens* after Colistin Administration in a Hospital Setting. *J Clin Microbiol*. 2013, 51:2295-2302.

58. Hayakawa K, Marchaim D, Divine GW, Pogue JM, Kumar S, Lephart P, Risko K, Sobel JD, Kaye KS: Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. *International Journal of Infectious Diseases.* 2012, 16:e646-e648.

59. World Health O: *GLASS: the detection and reporting of colistin resistance* edn 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2021.

60. Kawasaki K, China K, Nishijima M: Release of the Lipopolysaccharide Deacylase PagL from Latency Compensates for a Lack of Lipopolysaccharide Aminoarabinose Modification-

Dependent Resistance to the Antimicrobial Peptide Polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 2007, 189:4911-4919.

61. Trent MS, Pabich W, Raetz CRH, Miller SI: A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) That Catalyzes 3-O-Deacylation of Lipid A Precursors in Membranes of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276:9083-9092.

62. Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT: Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016, 60:3709-3716.

63. McConville TH, Annavajhala MK, Giddins MJ, Macesic N, Herrera CM, Rozenberg FD, Bhushan GL, Ahn D, Mancia F, Trent MS, et al.: CrrB Positively Regulates High-Level Polymyxin Resistance and Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Reports.* 2020, 33:108313.

64. Zhang S, Abbas M, Rehman MU, Wang M, Jia R, Chen S, Liu M, Zhu D, Zhao X, Gao Q, et al.: Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. *Science of The Total Environment.* 2021, 799:149280.

65. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, Tryfinopoulou K, Vatopoulos A, Rossolini GM, Group CS: MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014, 58:5696-5703.

66. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas M-V, Ozdamar M, Türkoglu S, Nordmann P: The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2014, 70:75-80.

67. Skov RL, Monnet DL: Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 2016, 21:30155.

68. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR: Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2020, 75:3087-3095.

69. Mmatli M, Mbelle NM, Osei Sekyere J: Global epidemiology, genetic environment, risk factors and therapeutic prospects of *mcr* genes: A current and emerging update. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2022, 12.

70. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, et al.: Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016, 16:161-168.

71. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S: Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016, 21.

72. Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, Ye H, Liu F, Srinivas S, Li D, et al.: Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS pathogens.* 2016, 12:e1005957-e1005957.

73. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y: Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio.* 2017, 8:e00543-00517.

74. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF: Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2017, 22.

75. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B: Identification of 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.* 2017, 72:3317-3324.

76. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, Randall LP, Lemma F, Crook DW, Teale C, et al.: *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2017, 72:2745-2749.

77. Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN: Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018, 73:1791-1795.

78. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, Zhang S, Shen J, Shen Z, Wang Y: Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* 2018, 7:122.

79. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M: Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio.* 2019, 10.

80. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z: Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections.* 2020, 9:508-516.

81. Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL, et al.: Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Research in Veterinary Science.* 2016, 105:134-135.

82. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A: Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol.* 2016, 7.

83. Shen Y, Xu C, Sun Q, Schwarz S, Ou Y, Yang L, Huang Z, Eichhorn I, Walsh TR, Wang Y, et al.: Prevalence and Genetic Analysis of *mcr-3*-Positive *Aeromonas* Species from Humans, Retail Meat, and Environmental Water Samples. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018, 62:e00404-00418.

84. Valiakos G, Kapna I: Colistin Resistant *mcr* Genes Prevalence in Livestock Animals (Swine, Bovine, Poultry) from a Multinational Perspective. A Systematic Review. *Veterinary Sciences.* 2021, 8.

85. García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J: Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Int J Antimicrob Agents.* 2018, 52:104-108.

86. Carattoli A, Carretto E, Brovarone F, Sarti M, Villa L: Comparative analysis of an *mcr-4 Salmonella enterica* subsp. *enterica* monophasic variant of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2018, 73:3332-3335.

87. Kneis D, Berendonk TU, Heß S: High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater. *Sci Total Environ.* 2019, 694:133454.

88. Xu T, Zhang C, Ji Y, Song J, Liu Y, Guo Y, Zhou K: Identification of *mcr-10* carried by self-transmissible plasmids and chromosome in *Enterobacter roggenkampii* strains isolated from hospital sewage water. *Environ Pollut.* 2021, 268:115706.

89. Manandhar S, Nguyen Q, Pham DT, Amatya P, Rabaa M, Dongol S, Basnyat B, Dixit SM, Baker S, Karkey A: A fatal outbreak of neonatal sepsis caused by *mcr-10*-carrying *Enterobacter kobei* in a tertiary care hospital in Nepal. *J Hosp Infect.* 2022, 125:60-66.

90. Xu L, Wan F, Fu H, Tang B, Ruan Z, Xiao Y, Luo Q: Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-10* in Enterobacterales Isolates Recovered from Fecal Samples of Chickens, Slaughterhouse Workers, and a Nearby Resident. *Microbiol Spectr.* 2022, 10:e0041822.

91. Liao W, Cui Y, Quan J, Zhao D, Han X, Shi Q, Wang Q, Jiang Y, Du X, Li X, et al.: High prevalence of colistin resistance and *mcr-9/10* genes in *Enterobacter* spp. in a tertiary hospital over a decade. *Int J Antimicrob Agents.* 2022, 59:106573.

92. Tartor YH, Abd El-Aziz NK, Gharieb RMA, El Damaty HM, Enany S, Soliman EA, Abdellatif SS, Attia ASA, Bahnass MM, El-Shazly YA, et al.: Whole-Genome Sequencing of Gram-Negative Bacteria Isolated From Bovine Mastitis and Raw Milk: The First Emergence of Colistin *mcr-10* and Fosfomycin fosA5 Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae* in Middle East. *Front Microbiol.* 2021, 12:770813.

93. Biggel M, Zurfluh K, Hoehn S, Schmitt K, Frei A, Jans C, Stephan R: Complete Genome Sequence of Colistin-Resistant, *mcr-10*-Harboring, *Enterobacter cloacae* Isolate AVS0889, Recovered from River Water in Switzerland. *Microbiol Resour Announc.* 2022, 11:e0016522.

94. Partridge Sally R, Kwong Stephen M, Firth N, Jensen Slade O: Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018, 31:e00088-00017.

95. Veldman K, van Essen-Zandbergen A, Rapallini M, Wit B, Heymans R, van Pelt W, Mevius D: Location of colistin resistance gene *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from livestock and meat. *J Antimicrob Chemother.* 2016, 71:2340-2342.

96. Shen C, Zhong L-L, Ma F, El-Sayed Ahmed MAE-G, Doi Y, Zhang G, Liu Y, Huang S, Li H-Y, Zhang L, et al.: Genomic patterns and characterizations of chromosomally-encoded *mcr-1* in *Escherichia coli* populations. *Gut Pathog.* 2020, 12:55.

97. García-Meniño I, Díaz-Jiménez D, García V, de Toro M, Flament-Simon SC, Blanco J, Mora A: Genomic Characterization of Prevalent *mcr-1*, *mcr-4*, and *mcr-5 Escherichia coli* Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Front Microbiol.* 2019, 10.

98. Timmermans M, Wattiau P, Denis O, Boland C: Colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-5*, including a case of triple occurrence (*mcr-1*, *-3* and *-5*), in *Escherichia coli* isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016. *Int J Antimicrob Agents.* 2021, 57:106350.

99. Hammerl JA, Borowiak M, Schmoger S, Shamoun D, Grobbel M, Malorny B, Tenhagen B-A, Käsbohrer A: *mcr-5* and a novel *mcr-5.2* variant in *Escherichia coli* isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017. *J Antimicrob Chemother.* 2018, 73:1433-1435.

100. Wang Z, Fu Y, Schwarz S, Yin W, Walsh TR, Zhou Y, He J, Jiang H, Wang Y, Wang S: Genetic environment of colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* in *Escherichia coli* from one pig farm in China. *Vet Microbiol.* 2019, 230:56-61.

101. Centers for Disease Control and Prevention. One health. 2013. [Available from: http://www.cdc.gov/onehealth/index.html]

102. Stadtländer CTKH: One Health: people, animals, and the environment. *Infect Ecol Epidemiol.* 2015, 5:30514-30514.

103. George A: Antimicrobial resistance, trade, food safety and security. *One Health.* 2018, 5:6-8.

104. Livermore DM: The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect.* 2004, 10:1-9.

105. Nordmann P, Poirel L: Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect.* 2016, 22:398-400.

106. González-Torralba A, Oteo J, Asenjo A, Bautista V, Fuentes E, Alós J-I: Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Companion Dogs in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016, 60:2499-2501.

107. Figueiredo R, Card RM, Nunez-Garcia J, Mendonça N, da Silva GJ, Anjum MF: Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolated from Food Animal and Foodstuff May Also Be Less Susceptible to Heavy Metals. *Foodborne Pathog Dis.* 2019, 16:166-172.

108. Authority EFS, Prevention ECfD, Control: The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. 2022, 20:e07209.

109. Hembach N, Schmid F, Alexander J, Hiller C, Rogall ET, Schwartz T: Occurrence of the mcr-1 Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Front Microbiol*. 2017, 8.

110. Zhou H-W, Zhang T, Ma J-H, Fang Y, Wang H-Y, Huang Z-X, Wang Y, Wu C, Chen G-X: Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried *mcr-1* in Waterborne *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61:e00017-00017.

111. Khedher MB, Baron SA, Riziki T, Ruimy R, Raoult D, Diene SM, Rolain J-M: Massive analysis of 64,628 bacterial genomes to decipher water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes? *Scientific Reports.* 2020, 10:5970.

112. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.

113. European Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021. Trends from 2010 to 2020. Twelfth ESVAC report. 2022. EMA/795956/2022. Veterinary Medicines Division.

114. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Programa REDUCE ANTIBIÓTICOS en sector porcino, Plan Nacional Resistencia Antibióticos (PRAN). [Disponible en: https://www.resistenciaantibioticos.es/es/lineas-de-accion/control/programas-de-reduccion-en-sanidad-animal/programa-reduce-porcino]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

115. Kempf I, Jouy E, Chauvin C: Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents.* 2016, 48:598-606.

116. Le Devendec L, Mourand G, Bougeard S, Léaustic J, Jouy E, Keita A, Couet W, Rousset N, Kempf I: Impact of colistin sulfate treatment of broilers on the presence of resistant

bacteria and resistance genes in stored or composted manure. *Vet Microbiol.* 2016, 194:98-106.

117. Joint-FAO/WHO-Expert-Committee-on-food-additives. Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food: 66th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2006. WHO Technical Report Series 939.

118. European Medicines Agency, 2013. Overview of comments received on "Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health". 2013:44.

119. EMA, 2014. Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals - Answer to the second request from the EC (ranking of antibiotics); Answer to the third request from the EC (new antibiotics); Answer to the fourth request from the EC (risk mitigation options) (EMA/381884/2014) [Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2014/07/WC500170253.pdf]

120. Guyonnet J, Manco B, Baduel L, Kaltsatos V, Aliabadi MH, Lees P: Determination of a dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling for treatment of G.I.T. disease in pigs. *Res Vet Sci.* 2010, 88:307-314.

121. Carlsson U, Wallgren P, Renström LH, Lindberg A, Eriksson H, Thorén P, Eliasson-Selling L, Lundeheim N, Nörregard E, Thörn C, et al.: Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: detection, response and eradication. *Transbound Emerg Dis.* 2009, 56:121-131.

122. European Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. Trends from 2010 to 2020. Eleventh ESVAC report. 2021. EMA/58183/2021. Veterinary Medicines Division. [Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-2020-trends-2010-2020-eleventh_en.pdf#page=97&zoom=100,0,0]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

123. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los

antibióticos. [Disponible en: https://www.resistenciaantibioticos.es/es/quienes-somos]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

124. Sales trends (mg/PCU) of antibiotic VMPs for food-producing animals in Spain. 2022. EMA/767050/2022. Veterinary Medicines Division.

125. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Plan de Vigilancia Colistina. [Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/plandevigilanciacolistina_tcm30-378683.PDF]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

126. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. . Edited by. EUCAST. [Disponible en: https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

127. Roche JM BE, Zambardi G.: Early detection of colistin-resistant Gram-negative bacteria using chromID® Colistin R agar, a new chromogenic medium. In *ECCMID 2017*. Edited by. Vienna (Austria); 2017.

128. García-Fernández S, García-Castillo M, Ruiz-Garbajosa P, Morosini M-I, Bala Y, Zambardi G, Cantón R: Performance of CHROMID® Colistin R agar, a new chromogenic medium for screening of colistin-resistant Enterobacterales. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019, 93:1-4.

129. Cabal A, Gómez-Barrero S, Porrero C, Bárcena C, López G, Cantón R, Gortázar C, Domínguez L, Álvarez J: Assessment of virulence factors characteristic of human *Escherichia coli* pathotypes and antimicrobial resistance in O157:H7 and non-O157:H7 isolates from livestock in Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2013, 79:4170-4172.

130. Martins MT, Rivera IG, Clark DL, Stewart MH, Wolfe RL, Olson BH: Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. *Appl Environ Microbiol.* 1993, 59:2271-2276.

131. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, et al.: 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 Surveill.* 2018, 23.

132. Li J, Shi X, Yin W, Wang Y, Shen Z, Ding S, Wang S: A Multiplex SYBR Green Real-Time PCR Assay for the Detection of Three Colistin Resistance Genes from Cultured Bacteria, Feces, and Environment Samples. *Front Microbiol.* 2017, 8:2078.

133. Lalam N: Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J Theor Biol.* 2006, 242:947-953.

134. Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, Chan F, Gonzalez C, Zhang L, Samaha RR: Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics.* 2006, 7:59.

135. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA: A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods.* 2003, 278:261-269.

136. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A: Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020, 70:e102.

137. Seemann T: Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014, 30:2068-2069.

138. Seemann T: Abricate. Edited by. Github. [Disponible en: https://github.com/tseemann/abricate]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

139. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV: Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012, 67:2640-2644.

140. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H: In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58:3895-3903.

141. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, et al.: SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012, 19:455-477.

142. Robertson J, Nash JHE: MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom.* 2018, 4:e000206.

143. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, Hoffmann M, Pettengill JB, Prasad AB, Tillman GE, et al.: AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep.* 2021, 11:12728.

144. Törönen P, Medlar A, Holm L: PANNZER2: a rapid functional annotation web server. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46:W84-W88.

145. Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R: Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 1997, 28:405-420.

146. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B: Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* 2000, 16:944-945.

147. David Wilkins ZK: gggenes: Draw Gene Arrow Maps in 'ggplot2'. 2020. [Disponible en: https://wilkox.org/gggenes/]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

148. Wickham H: ggplot2. Use R! Springer International Publishing; 2016. [Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

149. Wickham H FR, Henry L, Müller K: dplyr: A Grammar of Data Manipulation. 2022. [Disponible en: https://dplyr.tidyverse.org, https://github.com/tidyverse/dplyr]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

150. World Health Organization (WHO). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 3rd Rev. 2011. [Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77376/;jsessionid=0C947CA333F9F82CF7708F537AE6FB85?sequence=1]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

151. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Texto pertinente a efectos del EEE). *Diario Oficial de la Unión Europea* 2010, 53:33-79.

152. Herrero-Encinas J, Blanch M, Pastor JJ, Mereu A, Ipharraguerre IR, Menoyo D: Effects of a bioactive olive pomace extract from Olea europaea on growth performance, gut function, and intestinal microbiota in broiler chickens. *Poult Sci.* 2019.

153. ISO 6579-1:2017. Edited by. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

154. Shannon CE, Weaver W, Weaver W: *The mathematical theory of communication*. *MD Comput.* 1997 Jul-Aug;14(4):306-17.

155. Pielou EC: The measurement of diversity in different types of biological collections. *J Theor Biol.* 1966, 13:131-144.

156. Cohen J: A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas*. 1960, 20:37-46.

157. European Committee on Antimicrobial Susceptibilty Testing (EUCAST). EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017. [Disponible en: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

158. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen AV, Cheng AA, Liu S, et al.: CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2020, 48:D517-d525.

159. Vidal A, Aguirre L, Seminati C, Tello M, Redondo N, Martín M, Darwich L: Antimicrobial Resistance Profiles and Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Neonatal Diarrhea in Spanish Pig Farms. *Vet Sci*. 2020, 7:48.

160. Aguirre L, Vidal A, Seminati C, Tello M, Redondo N, Darwich L, Martín M: Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (*mcr*) genes in *Escherichia coli* from swine between 1999 and 2018. *Porcine Health Manag.* 2020, 6:8.

161. Shafiq M, Huang J, Shah JM, Ali I, Rahman SU, Wang L: Characterization and resistant determinants linked to mobile elements of ESBL-producing and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* recovered from the chicken origin. *Microb Pathog.* 2021, 150:104722.

162. Gibbons JF, Boland F, Egan J, Fanning S, Markey BK, Leonard FC: Antimicrobial Resistance of Faecal *Escherichia coli* Isolates from Pig Farms with Different Durations of In-feed Antimicrobial Use. *Zoonoses Public Health*. 2016, 63:241-250.

163. European Medicines Agency. Spain trends sales antimicrobial VMPs food producing animals between 2010-2020. 2021. EMA/510455/2021. Veterinary Medicines Division. [Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/spain-trends-sales-antimicrobial-vmps-food-producing-animals-between-2010-2020_en.pdf]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

164. Dandachi I, Chabou S, Daoud Z, Rolain J-M: Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin. *Front Microbiol*. 2018, 9.

165. Aarestrup FM, Kruse H, Tast E, Hammerum AM, Jensen LB: Associations Between the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion and the Occurrence of Resistance among *Enterococcus faecium* from Broilers and Pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microb Drug Resist.* 2000, 6:63-70.

166. Tiseo K, Huber L, Gilbert M, Robinson TP, Van Boeckel TP: Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics (Basel).* 2020, 9.

167. Mourão J, Novais C, Machado J, Peixe L, Antunes P: Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:− clones circulating in Europe. *Int J Antimicrob Agents.* 2015, 45:610-616.

168. Salam LB: Unravelling the antibiotic and heavy metal resistome of a chronically polluted soil. *3 Biotech.* 2020, 10:238-238.

169. Zhang S, Abbas M, Rehman MU, Huang Y, Zhou R, Gong S, Yang H, Chen S, Wang M, Cheng A: Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) via integrons in *Escherichia coli*: A risk to human health. *Environ Pollut.* 2020, 266:115260.

170. Nordmann P, Naas T, Poirel L: Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011, 17:1791-1798.

171. Cienfuegos-Gallet AV, Ocampo de Los Ríos AM, Sierra Viana P, Ramirez Brinez F, Restrepo Castro C, Roncancio Villamil G, del Corral Londoño H, Jiménez JN: Risk factors and survival of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a KPC endemic setting: a case-control and cohort study. *BMC Infect Dis.* 2019, 19:830.

172. Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L: High Rate of MCR-1-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Pigs, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2017, 23:2023-2029.

173. Alba P, Leekitcharoenphon P, Franco A, Feltrin F, Ianzano A, Caprioli A, Stravino F, Hendriksen RS, Bortolaia V, Battisti A: Molecular Epidemiology of *mcr*-Encoded Colistin Resistance in *Enterobacteriaceae* From Food-Producing Animals in Italy Revealed Through the EU Harmonized Antimicrobial Resistance Monitoring. *Front Microbiol.* 2018, 9.

174. Lepelletier D, Bonnet R, Plesiat P, Nicolas-Chanoine MH, Berger-Carbonne A, Chidiac C, Grandbastien B: Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1*) among *Enterobacteriaceae* strains: Laboratory detection of resistance and measures to control its dissemination. *Med Mal Infect.* 2018, 48:250-255.

175. Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM: Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PloS one.* 2018, 13:e0195281-e0195281.

176. Luo Q, Wang Y, Xiao Y: Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health.* 2020, 2:71-78.

177. Hala S, Antony CP, Momin AA, Alshehri M, Ben-Rached F, Al-Ahmadi G, Zakri S, Baadhaim M, Alsaedi A, Thaqafi OAA, et al.: Co-occurrence of mcr-1 and mcr-8 genes in multi-drug-resistant Klebsiella pneumoniae from a 2015 clinical isolate. *Int J Antimicrob Agents.* 2021, 57:106303.

178. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, Han ML, Wang J, Strugnell RA, Velkov T, Li J: Fitness cost of *mcr-1*-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018, 73:1604-1610.

179. Liu L, Feng Y, Zhang X, McNally A, Zong Z: New Variant of *mcr-3* in an Extensively Drug-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolate Carrying *mcr-1* and *blaNDM-5*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017, 61:e01757-01717.

180. Clemente L, Manageiro V, Correia I, Amaro A, Albuquerque T, Themudo P, Ferreira E, Caniça M: Revealing *mcr-1*-positive ESBL-producing *Escherichia coli* strains among *Enterobacteriaceae* from food-producing animals (bovine, swine and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010–2015. *Int J Food Microbiol.* 2019, 296:37-42.

181. Sadek M, Ortiz de la Rosa JM, Abdelfattah Maky M, Korashe Dandrawy M, Nordmann P, Poirel L: Genomic Features of MCR-1 and Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacterales from Retail Raw Chicken in Egypt. *Microorganisms.* 2021, 9:195.

182. Shafiq M, Huang J, Ur Rahman S, Shah JM, Chen L, Gao Y, Wang M, Wang L: High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *bla* (CTX-M-15) recovered from pigs. *Infect Drug Resist.* 2019, 12:2135-2149.

183. Li X, Li L, Yu L, Liu S, Liu L, Wei X, Song Y, Liu C, Jiang M, Wang F: Prevalence of avian-origin *mcr-1*–positive *Escherichia coli* with a potential risk to humans in Tai'an, China. *Poult Sci.* 2020, 99:5118-5126.

184. Geser N, Stephan R, Hächler H: Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res.* 2012, 8:21.

185. Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R: Prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol.* 2013, 79:3027-3032.

186. Suetens C, Latour K, Kärki T, Ricchizzi E, Kinross P, Moro ML, Jans B, Hopkins S, Hansen S, Lyytikäinen O, et al.: Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Euro Surveill.* 2018, 23:1800516.

187. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, Sievert DM: Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016, 37:1288-1301.

188. Kaye KS, Cosgrove S, Harris A, Eliopoulos GM, Carmeli Y: Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum cephalosporins among *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45:2628-2630.

189. Reisbig MD, Hossain A, Hanson ND: Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded *ampC* genes of Enterobacter origin. *J Antimicrob Chemother.* 2003, 51:1141-1151.

190. Fischer J, San José M, Roschanski N, Schmoger S, Baumann B, Irrgang A, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B: Spread and persistence of VIM-1 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in three German swine farms in 2011 and 2012. *Vet Microbiol.* 2017, 200:118-123.

191. Authority EFS, Prevention ECfD, Control: The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. 2018, 16:e05182.

192. Vergara A, Pitart C, Montalvo T, Roca I, Sabaté S, Hurtado JC, Planell R, Marco F, Ramírez B, Peracho V, et al.: Prevalence of Extended-Spectrum-β-Lactamase- and/or Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Yellow-Legged Gulls from Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61.

193. Avison MB, Niumsup P, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM: Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* β-lactamase regulator, BlrA. *J Antimicrob Chemother.* 2004, 53:197-202.

194. Ko WC, Lee HC, Chuang YC, Liu CC, Wu JJ: Clinical Features and Therapeutic Implications of 104 Episodes of Monomicrobial *Aeromonas* Bacteraemia. *J Infect.* 2000, 40:267-273.

195. Sinclair HA, Heney C, Sidjabat HE, George NM, Bergh H, Anuj SN, Nimmo GR, Paterson DL: Genotypic and phenotypic identification of *Aeromonas* species and CphA-mediated carbapenem resistance in Queensland, Australia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016, 85:98-101.

196. Ceyhan M, Celik M: *Elizabethkingia meningosepticum* (*Chryseobacterium meningosepticum*) Infections in Children. *Int J Pediatr.* 2011, 2011:215237.

197. Moore LS, Owens DS, Jepson A, Turton JF, Ashworth S, Donaldson H, Holmes AH: Waterborne Elizabethkingia meningoseptica in Adult Critical Care. *Emerg Infect Dis.* 2016, 22:9-17.

198. Bellais S, Aubert D, Naas T, Nordmann P: Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44:1878-1886.

199. Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y, Zankari E, Leekitcharoenphon P, Stegger M, Kaas RS, et al.: Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill*. 2015, 20:30085.

200. Migura-Garcia L, Gonzalez-Lopez JJ, Martinez-Urtaza J, Aguirre Sanchez JR, Moreno-Mingorance A, Perez de Rozas A, Hofle U, Ramiro Y, Gonzalez-Escalona N: *mcr*-Colistin Resistance Genes Mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 Plasmids in *Escherichia coli* of Pigs and White Stork in Spain. *Front Microbiol.* 2019, 10:3072.

201. Zhao F, Feng Y, Lü X, McNally A, Zong Z: Remarkable Diversity of *Escherichia coli* Carrying *mcr-1* from Hospital Sewage with the Identification of Two New *mcr-1* Variants. *Front Microbiol*. 2017, 8.

202. Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, Jin L, Zhang Q, Liu Y, Rieux A, et al.: The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun.* 2018, 9:1179.

203. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J: Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018, 73:1121-1137.

204. Sun J, Fang L-X, Wu Z, Deng H, Yang R-S, Li X-P, Li S-M, Liao X-P, Feng Y, Liu Y-H: Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-1* Acquisition. *Sci Rep.* 2017, 7:424-424.

205. Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, Michael GB, Schwarz S, Werner G, Kreienbrock L, et al.: Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis.* 2016, 16:282-283.

206. Gallardo A, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez L, Quesada A: Involvement of *hpap2* and *dgkA* Genes in Colistin Resistance Mediated by *mcr* Determinants. *Antibiotics (Basel).* 2020, 9.

207. Neuwald AF: An unexpected structural relationship between integral membrane phosphatases and soluble haloperoxidases. *Protein Sci.* 1997, 6:1764-1767.

208. Choi Y, Lee J-Y, Lim S-K, Ko KS: Intact pap2 downstream of mcr-1 appears to be required for colistin resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020, 97:114997.

209. Hadjadj L, Riziki T, Zhu Y, Li J, Diene SM, Rolain J-M: Study of *mcr-1* Gene-Mediated Colistin Resistance in *Enterobacteriaceae* Isolated from Humans and Animals in Different Countries. *Genes (Basel).* 2017, 8:394.

210. Pathak E, Atri N, Mishra R: Analysis of P-Loop and its Flanking Region Subsequence of Diverse NTPases Reveals Evolutionary Selected Residues. *Bioinformation.* 2014, 10:216-220.

211. Gomis-Rüth FX, Solà Ma, Pérez-Luque R, Acebo P, Alda MT, González A, Espinosa M, del Solar G, Coll M: Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the pMV158-encoded plasmid transcriptional repressor protein CopG. *FEBS Lett*. 1998, 425:161-165.

212. Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, et al.: The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40:D290-301.

213. Nang SC, Li J, Velkov T: The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit Rev Microbiol.* 2019, 45:131-161.

214. Harmer CJ, Moran RA, Hall RM: Movement of IS*26*-Associated Antibiotic Resistance Genes Occurs via a Translocatable Unit That Includes a Single IS*26* and Preferentially Inserts Adjacent to Another IS*26*. *mBio*. 2014, 5:e01801-01814.

215. Furlan JPR, Lopes R, Ramos MS, dos Santos LDR, da Silva Rosa R, Savazzi EA, Stehling EG: Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* ST1775-H137 co-harboring *blaCTX-M-2* and *blaCMY-2* recovered from an urban stream. *Infect Genet Evol.* 2021, 96:105156.

216. Huang B, He Y, Ma X, Cai R, Zeng J, Lu Y, Zhang W, Lan K, E S, Tang Y-W, et al.: Promoter Variation and Gene Expression of *mcr-1*-Harboring Plasmids in Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018, 62:e00018-00018.

217. García-Fernández A, Carattoli A: Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum β-lactamase and quinolone resistance genes. *J of Antimicrob Chemother.* 2010, 65:1155-1161.

218. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K: Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol.* 2015, 6.

219. Donà V, Bernasconi OJ, Pires J, Collaud A, Overesch G, Ramette A, Perreten V, Endimiani A: Heterogeneous Genetic Location of *mcr-1* in Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Humans and Retail Chicken Meat in Switzerland: Emergence of *mcr-1*-Carrying IncK2 Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017, 61:e01245-01217.

220. Yu H, Qu F, Shan B, Huang B, Jia W, Chen C, Li A, Miao M, Zhang X, Bao C, et al.: Detection of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* from Different Hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016, 60:5033-5035.

221. Liu Z, Liu Y, Xi W, Liu S, Liu J, Mu H, Chen B, He H, Fan Y, Ma W, et al.: Genetic Features of Plasmid- and Chromosome-Mediated *mcr-1* in *Escherichia coli* Isolates From Animal Organs With Lesions. *Front Microbiol.* 2021, 12:707332.

222. Fang L, Li X, Li L, Li S, Liao X, Sun J, Liu Y: Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Sci Rep.* 2016, 6:25312.

223. Biery MC, Lopata M, Craig NL: A minimal system for Tn*7* transposition: the transposon-encoded proteins TnsA and TnsB can execute DNA breakage and joining reactions that generate circularized Tn*7* species. *J Mol Biol*. 2000, 297:25-37.

224. Seiler C, Berendonk T: Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol*. 2012, 3.

225. Commission Regulation 1831/2003/EC. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union* 2003, 46.

226. Guo S, Tay MYF, Thu AK, Seow KLG, Zhong Y, Ng LC, Schlundt J: Conjugative IncX1 Plasmid Harboring Colistin Resistance Gene *mcr-5.1 in Escherichia coli* Isolated from Chicken Rice Retailed in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019, 63.

227. Sun J, Xu Y, Gao R, Lin J, Wei W, Srinivas S, Li D, Yang RS, Li XP, Liao XP, et al.: Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *mBio.* 2017, 8.

228. Partridge SR: *mcr-2* in the IncX4 plasmid pKP37-BE is flanked by directly oriented copies of ISEc69. *J Antimicrob Chemother.* 2017, 72:1533-1535.

229. Shintani M, Takahashi Y, Yamane H, Nojiri H: The Behavior and Significance of Degradative Plasmids Belonging to Inc Groups in *Pseudomonas* within Natural Environments and Microcosms. *Microbes Environ.* 2010, 25:253-265.

230. Popowska M, Krawczyk-Balska A: Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Front Microbiol.* 2013, 4:44.

231. Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P, Goossens H: Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. *Lancet Infect Dis.* 2016, 16:283-284.

232. Lu X, Hu Y, Luo M, Zhou H, Wang X, Du Y, Li Z, Xu J, Zhu B, Xu X, et al.: MCR-1.6, a New MCR Variant Carried by an IncP Plasmid in a Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolate from a Healthy Individual. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61.

233. Saavedra SY, Diaz L, Wiesner M, Correa A, Arévalo SA, Reyes J, Hidalgo AM, de la Cadena E, Perenguez M, Montaño LA, et al.: Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring *mcr-1* in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61.

234. Zhao F, Feng Y, Lü X, McNally A, Zong Z: IncP Plasmid Carrying Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Sewage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61.

235. Lv L, Cao Y, Yu P, Huang R, Wang J, Wen Q, Zhi C, Zhang Q, Liu JH: Detection of *mcr-1* Gene among *Escherichia coli* Isolates from Farmed Fish and Characterization of *mcr-1*-Bearing IncP Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018, 62.

236. ISfinder. Laboratoire de Microbiologie et Genetique Moleculaires. [Actualizado el 6 de enero de 2023. [Disponible en: https://www-is.biotoul.fr/index.php#]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

237. Sun J, Li XP, Fang LX, Sun RY, He YZ, Lin J, Liao XP, Feng Y, Liu YH: Co-occurrence of *mcr-1* in the chromosome and on an IncHI2 plasmid: persistence of colistin resistance in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 2018, 51:842-847.

238. Gallardo A, Iglesias M-R, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Gutiérrez G, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez L, Quesada A: The Plasmid-Mediated *Kluyvera*-Like *arnBCADTEF* Operon Confers Colistin (Hetero) Resistance to *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021, 65:e00091-00021.

239. Shen C, Zhong L-L, Yang Y, Doi Y, Paterson DL, Stoesser N, Ma F, El-Sayed Ahmed MAE-G, Feng S, Huang S, et al.: Dynamics of *mcr-1* prevalence and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* after the cessation of colistin use as a feed additive for animals in China: a prospective cross-sectional and whole genome sequencing-based molecular epidemiological study. *Lancet Microbe.* 2020, 1:e34-e43.

240. Fang L-X, Li X-P, Deng G-H, Li S-M, Yang R-S, Wu Z-W, Liao X-P, Sun J, Liu Y-H: High Genetic Plasticity in Multidrug-Resistant Sequence Type 3-IncHI2 Plasmids Revealed by Sequence Comparison and Phylogenetic Analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018, 62:e02068-02017.

241. Phalakornkule C, Nuchdang S, Khemkhao M, Mhuantong W, Wongwilaiwalin S, Tangphatsornruang S, Champreda V, Kitsuwan J, Vatanyoopaisarn S: Effect of freeze-thaw process on physical properties, microbial activities and population structures of anaerobic sludge. *J Biosci Bioeng.* 2017, 123:474-481.

242. Lautenbach E, Santana E, Lee A, Tolomeo P, Black N, Babson A, Perencevich EN, Harris AD, Smith CA, Maslow J: Efficient Recovery of Fluoroquinolone-Susceptible and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Strains From Frozen Samples. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008, 29:367-369.

243. Dorsaz S, Charretier Y, Girard M, Gaïa N, Leo S, Schrenzel J, Harbarth S, Huttner B, Lazarevic V: Changes in Microbiota Profiles After Prolonged Frozen Storage of Stool Suspensions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020, 10.

244. Bassis CM, Moore NM, Lolans K, Seekatz AM, Weinstein RA, Young VB, Hayden MK, for the CDCPEP: Comparison of stool versus rectal swab samples and storage conditions on bacterial community profiles. *BMC Microbiol.* 2017, 17:78.

245. Shao W, Khin S, Kopp WC: Characterization of Effect of Repeated Freeze and Thaw Cycles on Stability of Genomic DNA Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Biopreserv Biobank.* 2012, 10:4-11.

246. Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal. Edited by; 1970:82-98.

247. European Commission, 2003. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of zinc in feedingstuffs (14 March 2003). [Disponible en: https://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out120_en.pdf]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

248. Commission Regulation (EC) No 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Official Journal of the European Union, L187* 2003, 46:0011 - 0015.

249. Higuera MÁ: Impacto de la retirada del Óxido de Zinc en porcino. *ANPROGAPOR* 2017.

250. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Principales indicadores economicos del sector porcino 2020. . Edited by. Gobierno de España: Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas. 0031919163X; 2020. [Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectorporcino2020_tcm30-379728.pdf]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

251. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. . Edited by: Plan Nacional Resistencia Antibióticos; 2018. [Disponible en: https://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-jiacra-espana]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

252. Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA: JIACRA III 2016-2018. *Efsa j* 2021, 19:e06712.

253. Gagliotti C, Bolzoni L, Carretto E, Sarti M, Ricchizzi E, Ambretti S, Barozzi A, Bracchi C, Confalonieri M, Menozzi I, et al.: Reduction trend of *mcr-1* circulation in Emilia-Romagna Region, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021.

254. Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen B-A, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, Roesler U, Käsbohrer A: Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010-2015. *PloS one.* 2016, 11:e0159863-e0159863.

255. Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, Liu D, Lu J, Guo Y, Xia X, et al.: Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis.* 2020, 20:1161-1171.

256. Sun J, Zeng X, Li X-P, Liao X-P, Liu Y-H, Lin J: Plasmid-mediated colistin resistance in animals: current status and future directions. *Anim Health Res Rev.* 2017, 18:136-152.

257. Yang QE, MacLean C, Papkou A, Pritchard M, Powell L, Thomas D, Andrey DO, Li M, Spiller B, Yang W, et al.: Compensatory mutations modulate the competitiveness and dynamics of plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* clones. *The ISME journal.* 2020, 14:861-865.

258. Comisión Europea. Decisión de ejecución de la Comisión de 26.6.2017 relativa a las autorizaciones de comercialización, en el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de los medicamentos veterinarios que contengan «óxido de zinc» para su administración por vía oral a las especies destinadas a la producción de alimentos (Texto pertinente a efectos del EEE). 2017. [Disponible en: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170626136754/dec_136754_es.pdf]. Fecha último acceso: 23/03/2023.

259. Poirel L, Kieffer N, Nordmann P: In Vitro Study of ISApl1-Mediated Mobilization of the Colistin Resistance Gene mcr-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61:e00127-00117.

260. Sadler WW, Brownell JR, Fanelli MJ: Influence of Age and Inoculum Level on Shed Pattern of *Salmonella* Typhimurium in Chickens. *Avian Dis.* 1969, 13:793-803.

261. Litvak Y, Mon KKZ, Nguyen H, Chanthavixay G, Liou M, Velazquez EM, Kutter L, Alcantara MA, Byndloss MX, Tiffany CR, et al.: Commensal *Enterobacteriaceae* Protect against *Salmonella* Colonization through Oxygen Competition. *Cell Host Microbe.* 2019, 25:128-139.e125.

262. Ahmed S, Hansen C, Dahlkilde AL, Herrero-Fresno A, Pedersen KS, Nielsen JP, Olsen JE: The Effect of Colistin Treatment on the Selection of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Weaner Pigs. *Antibiotics.* 2021, 10.

263. Giordano C, Klak A, Barnini S, Chlebowicz MA, Menconi M, Rossen JW, Friedrich AW, Bathoorn E: Reduced Fitness Costs of *mcr-1.2* Compared to Mutated *pmrB* in Isogenic Colistin-Resistant KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*. 2019, 4:e00551-00519.

264. Harrison E, Brockhurst MA: Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol.* 2012, 20:262-267.

265. Authority EFS, Prevention ECfD, Control: The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. 2019, 17:e05598.

266. Timmerman T, Dewulf J, Catry B, Feyen B, Opsomer G, Kruif Ad, Maes D: Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Prev Vet Med.* 2006, 74:251-263.

267. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE: Multiplex PCR amplification assay for the detection of *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes in *Enterobacteriaceae*. *Apmis.* 2007, 115:1400-1408.

268. Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R: Dispersal of carbapenemase *blaVIM-1* gene associated with different Tn*402* variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54:320-327.

269. Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J, Oethinger M, Paterson DL, Adams MD, Jacobs MR, et al.: Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother.* 2009, 63:427-437.

270. Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R: Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2012, 50:1558-1563.

271. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P: Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48:15-22.

ANEXOS

Anexo I: Características de los cebadores empleados en los diferentes ensayos de PCR.

Tabla I. Cebadores usados para la detección por PCR del gen *uidA* para la identificación de la especie *E. coli.*

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Gen	Amplicón (pb)	Referencias
uidA-F	TGTGCCRGGMAGTTTTAAC	*uidA*	1175	(129)
uidA-R	TGATTATTKACCCACACTTTG			

Tabla II. Cebadores usados para la detección de genes de resistencia por PCR.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Gen	Amplicón (pb)	Referencias
mcr-1_F	AGTCCGTTTGTTCTTGTGGC	*mcr-1*	320	(131)
mcr-1_R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
mcr-2_F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	*mcr-2*	715	(131)
mcr-2_R	TCTAGCCCGACAAGCATACC			
mcr-3_F	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	*mcr-3*	929	(131)
mcr-3_R	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
mcr-4_F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	*mcr-4*	1,116	(131)
mcr-4_R	TTGGTCCATGACTACCAATG			
mcr-5_F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	*mcr-5*	1,644	(75)
mcr-5_R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG			
CTX-M-U1	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	bla_{CTX-M}	593	(267)
CTX-M-U2	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG			
SHV.SE	ATGCGTTATATTCGCCTGTG	bla_{SHV}	747	(267)
SHV.AS	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA			
TEM.SE	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	bla_{TEM}	445	(267)
TEM.AS	ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT			
VIM_F	ATGGTGTTTGGTCGCATATC	bla_{VIM}	510	(268)
VIM_R	TGGGCCATTCAGCCAGATC			
KPC_F	ATGTCACTGTATCGCCGTC	bla_{KPC}	882	(269)
KPC_R	TTACTGCCCGTTGACGCC			
NDM_F	AAGCTGAGCACCGCATTA	bla_{NDM}	714	(270)
NDM_R	GCTCATCACGATCATGTCT			
OXA-48_F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	bla_{OXA-48}	744	(271)
OXA-48_R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			

Tabla III. Cebadores para la detección del gen de resistencia a colistina *mcr-1* por PCR a tiempo real.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
mcr-1-qF	AAAGACGCGGTACAAGCAAC	*mcr-1*	213	(132)
mcr-1-qR	GCTGAACATACACGGCACAG			

Anexo II. Distribución de los valores de CMI frente a los antimicrobianos incluidos en el panel de sensibilidad por año y especie bacteriana

Tabla IV. Distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antimicrobiano por especie bacteriana en los aislados del cepario RESCOL.

REFERENCIA	AÑO	ESPECIE	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
VE06/00750SK1	2006	*S.* Enteritidis	4	2	>64	32	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
VE07/02823SM2	2007	*S* . Enteritidis	8	2	1	32	0,5	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
VE08/02626SM2	2008	*Salmonella* spp.	4	2	1	32	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
VE08/03066SM2	2008	*Salmonella* spp.	4	2	1	32	0,5	≤8	0,12	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,03
ZTA09/00762SM2	2009	*S.* Typhimurium	8	64	>64	>1024	0,5	4	0,03	4	0,25	8	0,5	≤0,25	0,25	≤0,03
ZTA10/00723SM2	2010	*S.* Rissen	4	>64	>64	>1024	0,5	64	0,03	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA10/00996SM2	2010	*S.* Typhimurium	8	64	64	>1024	0,5	128	0,03	4	0,25	8	0,5	≤0,25	0,25	≤0,03
ZTA11/00897SM2	2011	S. Enteritidis	8	1	1	32	0,5	≤8	0,25	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA11/01078SM2	2011	*S.* Typhimurium	8	64	>64	>1024	>32	128	0,12	16	0,25	4	0,5	0,5	0,5	≤0,03
ZTA11/01748EC	2011	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	16	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA11/02475SM2	2011	*S.* Typhimurium monofásica	4	64	>64	>1024	>32	128	0,03	8	1	4	0,5	≤0,25	0,25	≤0,03
12-1SRM-007	2012	S. Enteritidis	4	>64	1	128	≤0,25	≤8	0,03	≤4	≤0,5	4	≤0,25	0,5	0,5	≤0,03
ZTA13/01772-4SR2	2013	*S.* Enteritidis	4	1	1	128	0,5	4	0,25	128	0,25	4	NA	0,06	0,25	≤0,03
ZTA13/01834-5SR2	2013	*S.* Enteritidis	4	1	1	64	0,5	4	0,25	128	0,25	8	NA	≤0,25	0,25	≤0,03
ZTA13/01839-4SR2	2013	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	0,5	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/02182EC	2013	*E. coli*	4	64	32	2048	64	128	0.25	64	8	NA	NA	0.06	0.3	≤0,03
ZTA14/00045	2014	*S.* Typhimurium monofásica	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	4	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/00271EB	2014	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	64	8	>128	≤0,5	16	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/00277EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	8	0.5	4	>8	≤0,03
ZTA14/00566	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	0,5	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/00590EC	2014	*E. coli*	4	>64	64	≤8	≤0,25	≤8	2	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/00808EB	2014	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/00821EB	2014	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	4	≤0,25	8	2	≤0,03
ZTA14/00866EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	>128	0.5	128	≤0,5	4	≤0,25	4	>8	≤0,03
ZTA14/00979EC	2014	*E. coli*	4	>64	>64	64	≤0,25	≤8	>8	>128	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01001EC	2014	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	>128	8	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01003EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	64	>8	>128	32	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01056EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	0.5	32	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01057-1	2014	*E. coli*	4	64	64	2048	64	128	0.015	4	32	NA	NA	0.12	0.25	≤0,03
ZTA14/01057-14	2014	*E. coli*	4	64	64	2048	64	128	0.015	4	64	NA	NA	0.12	0.25	≤0,03
ZTA14/01057-2	2014	*E. coli*	8	64	128	2048	64	128	0.25	4	64	NA	NA	0.25	0.25	≤0,03
ZTA14/01057-24	2014	*E. coli*	4	64	128	2048	64	128	0.25	4	64	NA	NA	0.12	0.25	≤0,03
ZTA14/01057-3	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0.5	8	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01057-38	2014	*E. coli*	4	64	64	2048	64	128	0.015	4	64	NA	NA	0.12	0.25	≤0,03
ZTA14/01057-5	2014	*E. coli*	8	64	128	2048	64	128	0.015	4	64	NA	NA	0.12	0.25	≤0,03
ZTA14/01068EC	2014	*E. coli*	4	>64	>64	16	≤0,25	32	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01143EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	64	0.5	≤8	>8	>128	1	32	0.5	8	>8	≤0,03
ZTA14/01204EB	2014	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	16	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01217EC	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01286EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	0.5	64	>8	>128	≤0,5	16	0.5	8	>8	≤0,03
ZTA14/01290EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	>32	4	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA14/01295EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0.03	≤4	≤0,5	16	0.5	8	>8	≤0,03
ZTA14/01296EB	2014	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01312EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	32	8	>128	≤0,5	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01336EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	16	≤0,25	4	>8	≤0,03

REFERENCIA	AÑO	ESPECIE	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA14/01340EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	8	4	≤0,03
ZTA14/01385EB	2014	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	128	8	>128	>32	4	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01520-2SR2	2014	*S.* Enteritidis	8	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01520-3SR2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01557EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	8	>128	≤0,5	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01557EC	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	1	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01560EB	2014	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	16	≤0,25	4	>8	≤0,03
ZTA14/01562EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	32	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01573EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	16	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA14/01578EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	32	8	>128	≤0,5	8	≤0,25	4	>8	≤0,03
ZTA14/01592EB	2014	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	>8	>128	1	8	≤0,25	8	2	≤0,03
ZTA14/01612-2SK2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	64	0,5	≤8	0,03	≤4	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01623-2SK2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/01989	2014	*S.* Typhimurium monofásica	8	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/02013-1SR2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/02013-5SR2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/02014-2SR2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/02021-5SR2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA14/02029-2SR2	2014	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00163	2015	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00213-1EB1	2015	*E. coli*	4	>64	64	>1024	0.5	128	8	>128	≤0,5	64	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA15/00213-1SM2	2015	*S.* Rissen	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,03	4	0,5	8	0,5	0,25	0,5	≤0,03
ZTA15/00233EB1	2015	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	>128	16	>128	>32	32	≤0,25	4	4	≤0,03
ZTA15/00279EB1	2015	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	128	≤0,015	≤4	8	16	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA15/00280EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	16	>128	≤0,5	8	≤0,25	8	2	≤0,03
ZTA15/00309EC	2015	*E. coli*	4	≤1	>64	>1024	0.5	≤8	≤0,015	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00332EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	0.5	8	1	≤0,03
ZTA15/00389EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	16	>128	≤0,5	>64	≤0,25	8	2	≤0,03
ZTA15/00420EB1	2015	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0.25	64	16	64	≤0,25	8	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00428EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	16	>128	4	8	0.5	8	8	≤0,03
ZTA15/00539EC	2015	*E. coli*	4	>64	8	>1024	>32	128	0.5	>128	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00579-1EB1	2015	*E. coli*	4	>64	32	>1024	>32	128	16	>128	≤0,5	8	≤0,25	8	8	≤0,03
ZTA15/00630EB1	2015	*E. coli*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0.5	128	32	16	≤0,25	8	2	≤0,03
ZTA15/00685EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	16	>128	>32	>64	≤0,25	8	8	≤0,03
ZTA15/00691EB1	2015	*E. coli*	8	>64	>64	16	≤0,25	>128	8	>128	2	16	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA15/00700EC	2015	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	32	1	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00702EC	2015	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	32	1	128	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00735EB1	2015	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	>128	16	>128	1	8	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA15/00750EB1	2015	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	≤8	8	>128	1	4	≤0,25	>4	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01069COL1	2015	*E. coli*	4	64	16	8	0.5	4	0.5	4	0.5	NA	NA	0.06	0.25	NA
ZTA15/01071COL1	2015	*E. coli*	8	64	128	2048	64	128	16	128	64	NA	NA	0.12	0.25	NA
ZTA15/01072COL1	2015	*E. coli*	4	64	16	8	0.5	128	16	128	32	NA	NA	0.06	0.25	NA
ZTA15/01073COL1	2015	*E. coli*	8	64	128	2048	64	16	16	128	1	NA	NA	0.06	0.25	NA
ZTA15/01169-1EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	16	>128	>32	64	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA15/01196EB1	2015	*E. coli*	4	>64	≤2	>1024	>32	≤8	2	>128	1	8	≤0,25	8	4	≤0,03

REFERENCIA	AÑO	ESPECIE	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA15/01286EC	2015	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0.25	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01313EB1	2015	*E. coli*	2	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	8	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA15/01360EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	16	4	≤0,25	4	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01384EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	16	>128	32	8	≤0,25	8	1	≤0,03
ZTA15/01425-1EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32	16	>128	≤0,5	4	≤0,25	8	4	≤0,03
ZTA15/01493EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	16	>128	>32	4	≤0,25	8	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01518EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	16	>128	≤0,5	4	≤0,25	8	1	≤0,03
ZTA15/01568-4SR2	2015	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	64	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01704EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0.5	8	≤0,5	4	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA15/01825EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	16	>128	≤0,5	4	≤0,25	8	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01844EB1	2015	*E. coli*	4	>64	64	32	>32	≤8	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	>4	1	≤0,03
ZTA15/01918EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0.25	128	1	4	≤0,25	8	2	≤0,03
ZTA15/01928-1EB1	2015	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	8	>128	≤0,5	≤2	≤0,25	8	8	≤0,03
ZTA15/01962EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32		>128	1	4	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA15/02094EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0.5	>128	≤0,5	4	≤0,25	8	1	≤0,03
ZTA15/02163-1EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	128	8	>128	≤0,5	≤2	≤0,25	8	8	≤0,03
ZTA15/02267EB1	2015	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	16	>128	>32	8	≤0,25	8	8	≤0,03
ZTA15/02333EB2	2015	*E. coli*	4	>64	≤2	>1024	>32	>128	16	>128	>32	32	≤0,25	8	>8	≤0,03
ZTA16/00912COL1	2016	*E. coli*	4	>64	64	≤8	≤0,25	>128	0,03	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/00913COL1	2016	*E. coli*	4	>64	>64	32	≤0,25	>128	0,03	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/00925COL1	2016	*E. coli*	4	>64	64	16	≤0,25	≤8	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01190COL2	2016	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	32	>8	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01247COL1	2016	*E. coli*	8	>64	64	>1024	>32	64	0,5	≤4	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01268GRIS	2016	*E. coli*	8	NA	>64	>1024	>32	128	0.25	≤4	NA	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01268 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	8	>128	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01546COL1	2016	*E. coli*	4	>64	32	>1024	1	≤8	1	8	>32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01876 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01878 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01936GRIS	2016	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0.25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01937 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	128	0.25	128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01938 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01939 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/01940 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02147COL1	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	64	0,25	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02317 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02318 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02338GRIS	2016	*E. coli*	8	>64	>64	≤8	≤0,25	64	2	64	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02339 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02340GRIS	2016	*E. coli*	4	2	>64	>1024	>32	32	>8	>128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02392-1SR2	2016	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02392-5SR2	2016	*S.* Enteritidis	8	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02425 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	8	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02426 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	8	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02429 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	128	0.25	128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02430GRIS	2016	*K. pneumoniae*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	8	>128	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	AÑO	ESPECIE	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA16/02689-1 col8 lact (+)	2016	*E. asburiae*	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	2	>128	8	16	0,5	0,5	0,4	≤0,03
ZTA16/02689-2 col8 lact (+)	2016	*E. kobei*	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	4	>128	8	16	0,5	0,5	1	≤0,03
ZTA16/02690 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	128	0.25	128	NA	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02691 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	128	0.25	128	NA	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02859 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	8	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA16/02946 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02946 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02947 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02947 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02978GRIS	2016	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	≤8	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02979 col8 lact(+)	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02979 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02980 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02982 col8 lact(+)	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	64	0.25	≤4	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02982 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02983 col8 lact(+)	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	64	0,25	≤4	1	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/02983 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03000-4SR2	2016	*S.* Enteritidis	4	≤1	1	128	≤0,25	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03021 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	4	>64	>64	32	1	128	0,5	128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03022 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03022 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03054 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03055 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03056 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03057 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03058 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03059 col16 lact (+)	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA16/03059 HEMOLITICO	2016	*E. coli*	4	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00139COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	≤8	0,5	≤8	0,03	≤4	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00172COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00173COL1	2017	*E. coli*	4	>64	8	>1024	>32	64	>8	>128	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00192COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00199COL1	2017	*E. coli*	4	>64	4	>1024	>32	128	>8	>128	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00200COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	>128	8	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00201COL2	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	1	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	AÑO	ESPECIE	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA17/00202COL2	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	>128	1	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00203COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	≤0,25	≤8	0,25	128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00315COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	>8	>128	8	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00379COL1	2017	*E. coli*	8	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	>32	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00380COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	32	0,12	≤4	≤0,5	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00381COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	1	32	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00484COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,03	≤4	1	32	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00485COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	32	≤2	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00487COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	0,5	64	0,5	128	32	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00489COL1	2017	*E. cloacae*	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	4	>128	≤0,5	32	1	0,24	1	≤0,03
ZTA17/00489COL2	2017	*E. cloacae*	>16	>64	>64	>1024	>32	≤8	4	>128	≤0,5	32	0,5	1	1	≤0,03
ZTA17/00510COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	≤4	1	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00531COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	4	>128	1	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00619COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	1	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00641COL1	2017	*E. coli*	4	2	32	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00641COL2	2017	*C. youngae*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,12	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00695COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	>4	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00734 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	8	NA	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	NA	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00735 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00762COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	16	>32	64	≤0,015	≤4	1	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00788COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	8	0,5	>4	4	≤0,03
ZTA17/00790COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00817COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01007COL1	2017	*E. coli*	4	>64	16	>1024	>32	128	0,5	128	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01007COL2	2017	*C. youngae*	4	>64	64	>1024	>32	128	0,12	8	2	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01017COL1	2017	*E. coli*	4	2	≤2	16	≤0,25	≤8	0,25	64	16	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01023 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01024 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01062 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01063 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	>64	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01090COL2	2017	*E. asburiae*	>16	64	>64	256	>32	64	2	>128	1	32	1	5	9	0,06
ZTA17/01093COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01138COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	128	16	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01176 col8 lact (-)	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	0,5	≤8	>8	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01176 col8 lact (+)	2017	*E. coli*	4	>64	>64	32	0,5	>128	>8	>128	1	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01176 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01196COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	8	1	≤2	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01199COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	1	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01201COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,12	32	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01221COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,12	16	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01223COL1	2017	*E. coli*	4	>64	16	>1024	>32	>128	>8	>128	1	32	0,5	4	4	≤0,03
ZTA17/01233 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01235COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01300COL1	2017	*C. freundii*	8	>64	>64	16	1	16	1	>128	≤0,5	32	≤0,25	0,5	1	≤0,03
ZTA17/01324COL1	2017	*E. coli*	4	>64	8	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	AÑO	ESPECIE	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA17/01363COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01385COL1	2017	*E. coli*	4	>64	16	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01434COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,03	≤4	1	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01579COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	>1024	>32	>128	>8	>128	1	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01588COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	128	0,03	≤4	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01602COL1	2017	*E. coli*	2	>64	64	>1024	>32	128	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01610 col8 lact(+) colA	2017	*E. coli*	4	>64	>64	≤8	≤0,25	≤8	0,25	64	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01610 HEMOLITICO	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01631COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	32	1	128	0,5	128	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01678COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	32	0,5	≤8	0,03	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01678COL2	2017	*C. youngae*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,06	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01679COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	1024	>32	128	2	8	16	>64	≤0,25	≤0,25	1	≤0,03
ZTA17/01711COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	32	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01713COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01746COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01747COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,06	≤4	>32	>64	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01748COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01761COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,5	128	≤0,5	4	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA17/01777COL1	2017	*E. coli*	4	>64	64	16	≤0,25	≤8	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	>4	1	≤0,03
ZTA17/01779COL1	2017	*E. coli*	4	>64	≤2	>1024	≤0,25	64	>8	>128	2	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01780COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01782COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	8	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01809COL1	2017	*E. coli*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01810COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	16	0,5	8	2	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01812COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01813COL1	2017	*E. coli*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01814COL1	2017	*E. coli*	2	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01815COL1	2017	*E. coli*	4	>64	≤2	>1024	>32	16	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

Tabla V. Distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antimicrobiano por especie bacteriana en los aislados del cepario COLR.

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA10/00554RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA10/00601RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA10/01589RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	>64	≤8	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA11/01033RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	>1024	>32	32	1	>128	≤0,5	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA11/02334RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	>8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01376RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01690RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	16	≤0,25	128	≤0,015	≤4	16	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01850BL	*C. freundii*	*mcr-4*	8	>64	64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01862RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	1	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01903RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,5	8	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01903BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	≤8	≤0,25	≤8	0,03	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01906VD	*K. pneumoniae*	-	4	64	>64	>1024	>32	≤8	0,06	≤4	≤0,5	32	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01965RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	16	≤0,25	≤8	0,03	≤4	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01968RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0,5	>128	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/01968BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	>1024	>32	128	0,5	>128	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/02148RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	16	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA12/02176RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	1	16	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/00440BL	*C. freundii*	*mcr-4*	16	>64	>64	>1024	>32	≤8	2	>128	≤0,5	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/00440RS	*E. coli*	mcr-1	8	>64	>64	16	>32	≤8	0,5	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/00456RS	*E. coli*	mcr-1	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	4	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/00481RS	*E. coli*	mcr-1	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/01258RS	*E. coli*	mcr-1	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	>128	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/01378RS	*E. coli*	mcr-1	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	8	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/01379RS	*E. coli*	mcr-1	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	8	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA13/01536BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00235RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	32	8	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA15/00235BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,03	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00389RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00389BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,03	≤4	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00401RS	*E. coli*	-	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00420RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00628RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00628BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00630RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	>128	0,03	≤4	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00630BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	0,5	>128	2	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00630VD	*K. pneumoniae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	32	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00631RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	8	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00691RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	>8	>128	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00691BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	4	>64	16	16	≤0,25	>128	≤0,015	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00691VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	16	>64	64	32	0,5	>128	0,06	≤4	8	16	0,5	0,5	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00735RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	≤0,25	128	0,5	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00735BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	>1024	≤0,25	128	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00750RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00750BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	32	>32	64	0,5	>128	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00750VD	*K. oxytoca*	-	8	>64	>64	>1024	>32	>128	4	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00751RS	*E. coli*	*mcr-4*	4	>64	>64	>1024	>32	32	8	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00841BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	≤8	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00983RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	16	0,5	64	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/00983BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	>128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01196RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	8	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA15/01196BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	32	0,5	>128	0,03	≤4	1	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01313RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	1	16	32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01360RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01360VD	*K. oxytoca*	-	16	>64	>64	>1024	>32	128	1	>128	8	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01518RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,03	≤4	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01518BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,03	≤4	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01704RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01704BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/01918RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	8	0,5	128	2	8	≤0,25	>4	4	≤0,03
ZTA15/01962RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/02202RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,25	>128	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/02333RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA15/02333BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	>128	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00198RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00204RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00228RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	>4	1	≤0,03
ZTA17/00278RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00641RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	4	32	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00641BL	*S. enterica*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,06	8	≤0,5	8	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/00830RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	≤4	32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01593BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	8	2	>64	16	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01604RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	>1024	>32	>128	0,25	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/01679RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	8	>1024	>32	128	0,25	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/02684RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	≤8	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/02684BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	16	≤0,25	≤8	0,03	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA17/03056BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	≤8	0,12	128	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01727RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	32	0,5	>128	≤0,015	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01728BL	*C. freundii*	-	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01728RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	32	≤0,015	≤4	1	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01729RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	32	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01732RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	1	16	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01733RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01738RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	32	≤0,25	≤8	>8	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01740RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01741RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,03	≤4	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01741BL	*E. coli*	*mcr-1/ mcr-4*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	2	>128	8	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01748RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01749RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01750RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0,25	64	>32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01753RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	>128	1	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01754RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	128	1	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01755RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01756RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01757RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	16	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01804RS	*E. coli*	-	4	2	64	32	≤0,25	>128	4	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01805RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	8	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01806BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	32	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	>4	1	≤0,03
ZTA18/01806BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01807RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	4	>1024	>32	32	0,25	8	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01807BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	32	>1024	>32	32	0,5	>128	≤0,5	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA18/01809RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01811RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01812RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01813RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	>64	>1024	>32	64	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01813BL	*E. asburiae*	-	>16	4	>64	>1024	≤0,25	≤8	0,12	>128	8	>64	≤0,25	>4	>8	>16
ZTA18/01814RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01815RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	≤8	0,5	>128	>8	>128	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01816RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	>128	>8	>128	16	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01816BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01817RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,03	≤4	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01818RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01818VD	*E. asburiae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	128	0,12	128	8	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01819RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01820RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	>64	32	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01821RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01822RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01824RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01824BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01828BL	*C. freundii*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	1	>128	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01828RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	64	>1024	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01829RS	*E. coli*	-	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	>64	0,5	≤0,25	1	≤0,03
ZTA18/01829BL	*E. coli*	*mcr-2*	8	4	>64	>1024	>32	≤8	2	>128	4	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01830RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,25	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01830VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	16	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,06	≤4	≤0,5	8	0,5	>4	2	≤0,03
ZTA18/01832RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	1	64	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01832BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01833RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01834RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	4	>1024	>32	128	8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01835RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01836RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01836BL	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01857RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01858VD	*K. oxytoca*	-	8	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	1	8	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01859RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01860RS	*E. coli*	-	4	>64	>64	>1024	>32	64	>8	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01861RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	>8	>128	>32	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01861BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	≤8	0,5	8	16	8	≤0,25	>4	2	≤0,03
ZTA18/01862RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01863RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	4	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01869RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01870RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01870BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	≤8	≤0,25	≤8	>8	>128	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01871RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01872RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	32	≤0,25	>128	4	>128	32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01872BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	≤0,25	128	8	>128	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01873RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	8	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01874RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01890RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01890BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	>32	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01891RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA18/01891BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	4	2	≤2	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01892RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01893RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	2	128	16	4	≤0,25	>4	4	≤0,03
ZTA18/01897RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01898RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	>64	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01919RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	≤2	16	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01919VD	*K. pneumoniae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	≤8	2	>128	≤0,5	16	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01920RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	16	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01920VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	16	4	2	4	≤0,03
ZTA18/01921RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	16	>32	≤8	4	>128	1	4	0,5	>4	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01921VD	*K. pneumoniae*	-	>16	>64	32	64	0,5	≤8	0,03	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01923RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01924RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	>1024	≤0,25	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01924BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	>64	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01939RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	≤4	≤0,5	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01940RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01941RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	128	32	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01944VD	*K. pneumoniae*	-	>16	≤1	16	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	2	64	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01945VD	*C. freundii*	*mcr-1*	2	>64	>64	>1024	>32	>128	0,25	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01945RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01946RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	>8	>128	1	8	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01947RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	>64	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01948RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	≤8	0,12	64	>32	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01979RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01981RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	≤2	16	≤0,25	16	0,5	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01981BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	8	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01982RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	64	≤0,25	>128	1	16	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/01984RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	128	16	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02038RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	>128	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02039RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	>64	>1024	>32	128	0,25	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02039BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	32	≤0,25	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02040RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	>128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02041RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	≤1	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02042RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	16	>1024	>32	128	0,03	≤4	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02043RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02044RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02045RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02046VD	*A. hydrophila*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	128	8	>128	≤0,5	>64	2	≤0,25	≤0,5	0,5
ZTA18/02046RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02046BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	8	≤0,5	≤2	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA18/02047RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	32	>32	≤8	0,5	>128	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02048RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	128	0,25	64	>32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02048BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	>128	>8	>128	8	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02048VD	*R. ornithinolytica*	-	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	1	8	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02049RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	8	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02049BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02050RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	1	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02051RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	0,5	128	≤0,015	≤4	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02052RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02052BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	>4	>8	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA18/02053RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	32	2	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02055RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	0,25	128	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02084RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	32	≤0,25	≤8	0,25	128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02084BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	16	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02085RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	16	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02087RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02087BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	≤1	32	>1024	≤0,25	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02088RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	8	16	>32	64	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02089RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	>128	1	8	1	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02089VD	*K. pneumoniae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	2	>128	>32	32	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02090RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,25	128	1	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02091BL	*C. braakii*	-	8	>64	32	>1024	≤0,25	16	0,12	8	8	16	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02091RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,25	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02091VD	*K. pneumoniae*	-	4	64	>64	>1024	2	≤8	0,03	≤4	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02092RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	16	0,5	0,5	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02093RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02093BL	*E. fergusonii*	*mcr-1*	4	2	≤2	32	≤0,25	128	0,25	8	16	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02094RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	≤2	16	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02095RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,06	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02096RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02096VD	*K. pneumoniae*	*mcr-4*	>16	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,03	≤4	4	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02097RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	8	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02098RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02099RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02100RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02107RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02107BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	4	>64	>1024	>32	128	8	>128	32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02108RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	>64	16	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02109RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	>1024	0,5	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02110RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02110VD	*E. asburiae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	2	8	8	64	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02145BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02146RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02146BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02147RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02148RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02148BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	8	≤0,5	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02161VD	*R. ornithinolytica*	-	8	>64	>64	>1024	>32	>128	2	128	≤0,5	32	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02163RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	16	1024	>32	>128	>8	>128	1	16	0,5	0,5	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02163VD	*K. pneumoniae*	-	16	64	4	32	2	≤8	>8	>128	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02164RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02165RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	64	0,25	128	32	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02166RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,06	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02174RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02174VD	*K. pneumoniae*	-	16	64	>64	16	1	>128	>8	>128	32	8	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02188RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02188BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	64	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02189RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	64	1	>128	0,25	128	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02190BL	*C. freundii*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	>128	0,12	≤4	4	8	≤0,25	0,5	1	≤0,03
ZTA18/02191RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA18/02219BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	32	0,5	≤8	0,5	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02223RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0,5	128	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02225RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02226RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	128	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02228BL	*C. amalonaticus*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,03	≤4	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02228RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02314RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	64	>1024	>32	32	0,25	8	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02314BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	16	0,5	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02315RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	≤0,25	64	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02315BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02316RS	*E. coli*	*mcr-1*	2	>64	64	>1024	>32	32	0,25	128	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02317RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02318RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	0,25	8	4	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02320RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	8	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02321RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,12	≤4	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02322RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	64	>32	≤8	≤0,015	≤4	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02323RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,25	128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02323VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02324RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02325RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	32	>32	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02326RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	≤2	32	≤0,25	>128	0,5	8	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02327RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	>128	0,25	128	32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02328RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	8	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02328VD	*K. pneumoniae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	16	0,5	>4	>8	≤0,03
ZTA18/02329RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	16	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02330RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02331RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02339RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	8	>1024	>32	≤8	0,25	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02339VD	*E. cloacae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,06	≤4	≤0,5	32	1	0,5	1	≤0,03
ZTA18/02340RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02340BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,12	≤4	≤0,5	≤2	4	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02341RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	>64	>1024	0,5	>128	2	16	16	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02342RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02344RS	*E. coli*	-	8	2	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02345BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	8	≤0,5	4	≤0,25	4	>8	≤0,03
ZTA18/02346RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	≤0,25	32	0,25	64	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02350RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	≤0,25	>128	≤0,015	≤4	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02351VD	*K. pneumoniae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02352RS	*E. coli*	*mcr-1*	2	>64	4	>1024	>32	>128	>8	>128	8	>64	≤0,25	>4	8	≤0,03
ZTA18/02353RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	≤4	16	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02354RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	32	16	≤0,25	128	0,25	≤4	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02355RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	≤2	16	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02355BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02356RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	128	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02357RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	32	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02365RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02366RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,5	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02367RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02367BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,03	≤4	>32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02368RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA18/02394RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02396RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	>32	32	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA18/02397RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	>32	64	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA18/02400RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02401RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	>64	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA18/02403RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,25	128	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02404RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	16	≤0,25	≤8	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	>4	1	≤0,03
ZTA18/02404BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02406VD	*E. cloacae*	-	>16	8	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02407RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02408VD	*E. cloacae*	-	>16	32	≤2	16	0,5	≤8	0,03	≤4	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02476RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0,03	≤4	16	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02476BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0,25	128	16	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02476VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	16	>64	>64	32	1	>128	0,03	≤4	16	>64	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02477RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	>32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02477VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	8	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02478RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02479RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0,03	≤4	16	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02479BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	16	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02480RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02481VD	*R. ornithinolytica*	-	8	>64	>64	>1024	>32	>128	1	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02483RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	4	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02485RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,12	128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02486BL	*C. freundii*	*mcr-4*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	2	>128	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02486RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	8	>1024	>32	128	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02487RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	64	0,5	≤8	0,03	≤4	>32	16	≤0,25	≤0,25	1	≤0,03
ZTA18/02488RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02489RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	4	128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02490RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02491BL	*C. freundii*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	8	≤0,5	4	0,5	≤0,25	1	≤0,03
ZTA18/02491RS	*E. coli*	*mcr-4*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	128	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02492RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	16	≤0,25	≤8	8	>128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02493RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02494RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02496RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	16	0,25	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02497RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02509RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02509VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	16	16	0,5	≤0,25	2	≤0,03
ZTA18/02510VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	4	>128	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02511RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02512RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	16	1	≤8	4	>128	≤0,5	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02513RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	32	4	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02514RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02515RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	32	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02515VD	*R. ornithinolytica*	-	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02516BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	16	0,5	≤8	0,5	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02516VD	*R. ornithinolytica*	-	8	>64	>64	≤8	≤0,25	≤8	8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02517RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02518RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	1	8	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02519RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA18/02559RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	64	>1024	>32	64	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02560RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	8	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02561RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02563BL	*A. hydrophila*	-	>16	>64	32	>1024	>32	≤8	0,5	>128	16	64	2	1	≤0,5	0,25
ZTA18/02563RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02576RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	16	≤0,25	≤8	0,12	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02577RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	32	>32	128	0,25	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA18/02578VD	*R. ornithinolytica*	-	8	>64	>64	>1024	>32	>128	1	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00414RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00424RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	>1024	4	32	≤0,015	≤4	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00457RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00463VD	*A. hydrophila*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	64	8	>128	16	>64	2	≤0,25	≤0,5	0,5
ZTA19/00463RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00464RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	8	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00464BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	>8	>128	>32	8	0,5	>4	8	≤0,03
ZTA19/00466RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	≤2	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00466BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	>1024	>32	≤8	0,03	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00467VD	*C. youngae*	*mcr-4*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,12	≤4	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	1	≤0,03
ZTA19/00467RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	16	>32	≤8	0,25	128	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00468RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	>1024	>32	≤8	8	>128	≤0,5	8	≤0,25	>4	2	≤0,03
ZTA19/00469RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00474VD	*E. asburiae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	64	0,12	≤4	16	32	1	≤0,25	≤0,5	0,06
ZTA19/00475RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00477RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00478RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,5	8	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00479RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	>64	256	1	16	0,03	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00479BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	≤4	1	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00480RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	32	>32	128	0,25	128	2	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00485RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00488RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	128	0,25	128	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00506RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00528BL	*C. freundii*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	2	>128	16	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00528RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	2	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00529RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00530RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	16	>1024	>32	>128	0,12	64	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00530BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	4	>64	>1024	>32	>128	0,5	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00560RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	≤0,25	64	≤0,015	≤4	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00560BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	128	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00611RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	64	0,5	>128	0,03	≤4	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00612RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00613RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00614RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	8	64	0,5	≤8	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00616VD	*R. ornithinolytica*	-	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	1	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	1	0,06
ZTA19/00617RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00617BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	16	16	≤0,25	128	≤0,015	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00618RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00619RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00621RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	≤4	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00622RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00624RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	≤1	≤2	16	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA19/00625RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	1	64	8	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00625VD	*R. ornithinolytica*	-	8	>64	>64	>1024	>32	>128	1	16	≤0,5	32	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00634RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	4	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00676RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	4	>128	8	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00677RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	>8	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00678RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00690RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	64	≤0,25	128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00691RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	8	>1024	>32	64	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00692RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	16	8	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA19/00693RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	>64	≤0,25	>4	8	≤0,03
ZTA19/00697RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00697VD	*K. pneumoniae*	-	16	64	>64	>1024	>32	>128	0,25	8	≤0,5	32	1	≤0,25	1	≤0,03
ZTA19/00698RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	≤8	≤0,25	>128	>8	>128	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00699RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,25	64	≤0,5	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00720RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	>1024	16	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00721RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00731RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	>64	64	≤0,25	≤8	0,03	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00731BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,03	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	0,06
ZTA19/00852RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00853RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00854RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	16	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00898RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	16	≤0,25	≤8	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00899BL	*P. aerogenes*	-	8	>64	32	≤8	8	64	0,25	128	8	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	0,06
ZTA19/00900VD	*K. pneumoniae*	-	>16	32	>64	>1024	0,5	128	1	8	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00902RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00950VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	16	>64	≤2	>1024	>32	≤8	8	>128	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00952RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00953RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,5	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00953BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00954RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	0,25	128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00956RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00958RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/00959RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	32	≤2	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	2	≤0,03
ZTA19/00960BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	4	≤2	128	0,5	≤8	0,5	8	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01007RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	0,5	128	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01007VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	>16	>64	>64	>1024	>32	≤8	1	8	≤0,5	32	1	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01008RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	1024	≤0,25	>128	0,25	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01008BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01008VD	*R. ornithinolytica*	*mcr-4*	16	64	>64	>1024	0,5	>128	0,06	≤4	≤0,5	16	0,5	≤0,25	1	≤0,03
ZTA19/01010RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	4	32	>1024	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01012RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	>1024	≤0,25	128	0,03	≤4	≤0,5	>64	≤0,25	>4	1	≤0,03
ZTA19/01013RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	32	0,25	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01013BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01014RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	64	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01017RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	>128	0,25	64	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01019RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	>8	>128	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01096RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	32	128	0,5	≤8	>8	>128	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01126RS	*E. coli*	*mcr-2*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,06	16	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01128RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	16	>1024	>32	>128	0,5	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01161RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	1	8	32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA19/01162RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	0,25	≤4	≤0,5	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01163RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01210RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01256RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01256BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	32	≤0,25	≤8	0,5	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01258RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01262BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	128	≤0,5	4	≤0,25	0,5	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01265RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	32	64	≤0,25	>128	0,25	128	8	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01268RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	8	>128	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01269RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	16	0,5	>128	>8	>128	≤0,5	8	≤0,25	>4	8	≤0,03
ZTA19/01271RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,25	128	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01273VD	*K. pneumoniae*	-	16	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,06	≤4	≤0,5	>64	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01274RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	8	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01275RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	32	0,5	8	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01276RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01277RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	32	>32	128	>8	>128	>32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01280RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	≤2	>1024	>32	≤8	0,25	≤4	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01285RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01286RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	16	1	>128	0,5	128	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01386RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	≤0,25	≤8	0,03	≤4	≤0,5	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01474RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	16	≤0,25	≤8	0,5	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01475RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	16	0,5	≤8	1	128	1	64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01476VD	*R. ornithinolytica*	-	16	>64	>64	>1024	>32	>128	1	8	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01479RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	8	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01480RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,5	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01481RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	>8	>128	2	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01481BL	*E. coli*	-	4	>64	>64	>1024	>32	32	0,5	8	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01482RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	8	16	≤0,25	≤8	0,25	128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01483BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	4	64	64	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01484RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01485RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01488RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	64	>32	≤8	0,5	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01488BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	≤2	128	0,5	≤8	1	8	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01488VD	*E. cloacae*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	16	>8	>128	≤0,5	64	1	2	2	0,06
ZTA19/01494RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	>1024	>32	64	0,5	8	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01496RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01496BL	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	2	128	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01500RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	0,5	8	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01502RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	>1024	>32	32	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01522RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	64	16	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01536RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	64	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01557RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	32	>1024	>32	>128	0,5	128	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01561RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	≤1	4	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01562RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01569RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	4	>64	16	>32	≤8	2	64	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01574RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	64	2	8	≤0,5	4	≤0,25	0,5	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01576RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	32	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01584VD	*C. youngae*	*mcr-4*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	1	64	≤0,5	8	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01586RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	32	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01588RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03

REFERENCIA	ESPECIE	GENES *mcr*	COL	AMP	TET	SMX	TMP	CHL	CIP	NAL	GEN	AZI	TGC	FOT	TAZ	MERO
ZTA19/01589RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	>64	>1024	≤0,25	≤8	8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01590RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01593RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA19/01607RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	>8	>128	1	8	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA21/00096RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	0,03	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00116RS	*E. coli*	-	8	>64	64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00117RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	128	>8	>128	>32	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00126RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	8	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00141RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	>1024	>32	32	0,25	≤4	1	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00143RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	64	≤0,25	≤8	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00152VD	*E. cloacae*	-	>16	4	≤2	≤8	0,5	≤8	2	>128	≤0,5	32	≤0,25	≤0,25	≤0,5	0,06
ZTA21/00173RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	8	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00184RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	4	>1024	>32	128	>8	>128	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00184BL	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	64	32	>32	≤8	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00185RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	≤1	64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00187RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00204RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00206RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	4	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00210RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	32	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00255VD	*R. ornithinolytica*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	>128	4	32	>32	64	1	≤0,25	1	≤0,03
ZTA21/00260VD	*R. ornithinolytica*	-	>16	>64	>64	>1024	>32	≤8	1	8	4	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00263RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	2	≤2	16	≤0,25	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00263VD	*K. pneumoniae*	*mcr-1*	16	64	2	32	1	≤8	0,5	8	≤0,5	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00264RS	*E. coli*	*mcr-1*	16	>64	64	>1024	>32	128	4	128	>32	≤2	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00266RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	128	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00269RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	0,5	8	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00271RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	≤8	>32	32	0,5	8	≤0,5	>64	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00273VD	*E. asburiae*	-	>16	>64	>64	>1024	0,5	128	4	>128	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	0,06
ZTA21/00291RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,25	128	≤0,5	16	0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00293RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00311RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	32	>1024	>32	≤8	0,12	64	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00315RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	16	>1024	>32	128	0,25	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00317RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	1024	>32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00329RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	128	>8	>128	1	8	≤0,25	>4	>8	≤0,03
ZTA21/00338RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	64	>1024	>32	≤8	0,5	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00342RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	>1024	>32	128	0,25	8	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00344RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	64	≤2	>1024	>32	64	0,5	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00345RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	16	1024	32	32	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00346RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	2	≤2	32	0,25	≤8	0,5	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00348RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	16	>1024	>32	64	0,25	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00349RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	64	≤0,015	≤4	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00352RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	≤2	1024	32	64	0,5	8	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00380RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	≤8	>32	≤8	0,25	>128	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00396RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	≤0,25	16	2	>128	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00398RS	*E. coli*	*mcr-4*	8	>64	>64	16	≤0,25	≤8	>8	>128	16	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00411RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	16	>32	>128	0,03	≤4	1	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00412RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	0,5	8	>32	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00415RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	>64	>1024	>32	>128	≤0,015	≤4	≤0,5	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00416RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	16	0,5	64	1	8	≤0,5	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00417RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	32	≤8	>32	>128	≤0,015	≤4	>32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00418RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	≤8	>8	>128	1	16	≤0,25	>4	4	≤0,03
ZTA21/00419RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	8	>1024	>32	≤8	≤0,015	≤4	≤0,5	16	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00420RS	*E. coli*	*mcr-1*	4	>64	≤2	≤8	>32	≤8	>8	>128	16	8	≤0,25	≤0,25	≤0,5	≤0,03
ZTA21/00421RS	*E. coli*	*mcr-1*	8	>64	>64	>1024	>32	>128	1	16	1	16	0,5	≤0,25	0,5	≤0,03

Anexo III. Distribución de los perfiles de resistencia por año y especie bacteriana

Tabla VI. Distribución de los perfiles de resistencia por especie bacteriana de los aislados del cepario RESCOL.

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
VE06/00750SK1	2006	*S.* Enteritidis	AMP, COL, NAL, TET
VE07/02823SM2	2007	*S.* Enteritidis	AMP, COL, NAL
VE08/02626SM2	2008	*Salmonella* spp.	AMP, COL, NAL
VE08/03066SM2	2008	*Salmonella* spp.	AMP, COL, NAL
ZTA09/00762SM2	2009	*S.* Typhimurium	AMP, COL, SMX, TET, TGC
ZTA10/00723 SM2	2010	*S.* Rissen	AMP, CHL, COL, SMX, TET
ZTA10/00996 SM2	2010	*S.* Typhimurium	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TGC
ZTA11/00897SM2	2011	S. Enteritidis	COL, NAL
ZTA11/01078SM2	2011	*S.* Typhimurium	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA11/01748EC	2011	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET
ZTA11/02475SM2	2011	*S.* Typhimurium monofásica	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TGC, TMP
12-1SRM-007	2012	S. Enteritidis	AMP, COL, FOT, SMX, TAZ
ZTA13/01772-4SR2	2013	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX, TGC
ZTA13/01834-5SR2	2013	*S.* Enteritidis	COL, NAL, TGC
ZTA13/01839-4SR2	2013	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA13/02182EC	2013	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA14/00045	2014	*S.* Typhimurium monofásica	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA14/00271EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/00277EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/00566	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/00590EC	2014	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA14/00808EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/00821EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/00866EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/00979EC	2014	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA14/01001EC	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA14/01003EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/01056EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/01057-1	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TGC, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA14/01057-14	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA14/01057-2	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA14/01057-24	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA14/01057-3	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA14/01057-38	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA14/01057-5	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA14/01068EC	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, TET
ZTA14/01143EB	2014	*E. coli*	AMP, AZI, CIP, COL, FOT, NAL, TAZ, TET
ZTA14/01204EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01217EC	2014	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET
ZTA14/01286EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/01290EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01295EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01296EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01312EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/01336EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01340EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01385EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/01520-2SR2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/01520-3SR2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/01557EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01557EC	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA14/01560EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01562EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA14/01573EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA14/01578EB	2014	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/01592EB	2014	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA14/01612-2SK2	2014	*S.* Enteritidis	COL
ZTA14/01623-2SK2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/01989	2014	*S.* Typhimurium monofásica	AMP, COL, SMX, TET
ZTA14/02013-1SR2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/02013-5SR2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/02014-2SR2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/02021-5SR2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA14/02029-2SR2	2014	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA15/00163	2015	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA15/00213-1EB1	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA15/00213-1SM2	2015	*S.* Rissen	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00233EB1	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00279EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, GEN, SMX, TAZ, TET
ZTA15/00280EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00309EC	2015	*E. coli*	COL, SMX, TET
ZTA15/00332EB1	2015	*E. coli*	AMP, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00389EB1	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00420EB1	2015	*E. coli*	AMP, AZI, COL, FOT, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00428EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00539EC	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TMP
ZTA15/00579-1EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00630EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00685EB1	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00691EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, TAZ, TET

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA15/00700EC	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00702EC	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00735EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00750EB1	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TET
ZTA15/01069COL1	2015	*E. coli*	AMP, COL, TET, TGC
ZTA15/01071COL1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA15/01072COL1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET, TGC
ZTA15/01073COL1	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA15/01169-1EB1	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01196EB1	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TMP
ZTA15/01286EC	2015	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/01313EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01360EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, SMX, TET, TMP
ZTA15/01384EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01425-1EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01493EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/01518EB1	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01568-4SR2	2015	*S.* Enteritidis	COL, NAL
ZTA15/01704EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01825EB1	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TET
ZTA15/01844EB1	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01918EB1	2015	*E. coli*	AMP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01928-1EB1	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01962EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA15/02094EB1	2015	*E. coli*	AMP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/02163-1EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/02267EB1	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/02333EB2	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TMP
ZTA16/00912COL1	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET
ZTA16/00913COL1	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET
ZTA16/00925COL1	2016	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA16/01190COL2	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA16/01247COL1	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA16/01268GRIS	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01268HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01546COL1	2016	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, SMX, TET
ZTA16/01876HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01878HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01936GRIS	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01937HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01938HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01939HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/01940HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02147COL1	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET
ZTA16/02317HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02318HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02338GRIS	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, TET
ZTA16/02339HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02340GRIS	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02392-1SR2	2016	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA16/02392-5SR2	2016	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA16/02425HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02426HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02429HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02430GRIS	2016	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02689-1 col8 lact (+)	2016	*E. asburiae*	AMP, CHL, CIP, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02689-2 col8 lact (+)	2016	*E. kobei*	AMP, CHL, CIP, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA16/02690HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02691HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02859HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA16/02946 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02946HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02947 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02947HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02978GRIS	2016	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA16/02979 col8 lact(+)	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02979HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02980HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02982 col8 lact(+)	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET
ZTA16/02982HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/02983 col8 lact(+)	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET
ZTA16/02983HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03000-4SR2	2016	*S.* Enteritidis	COL, NAL, SMX
ZTA16/03021 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, TET
ZTA16/03022 col8 lact (+)	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03022HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA16/03054HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03055HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03056HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03057HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03058HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03059 col16 lact (+)	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA16/03059HEMOLITICO	2016	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00139COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, GEN, TET
ZTA17/00172COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00173COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TMP
ZTA17/00192COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00199COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TMP
ZTA17/00200COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA17/00201COL2	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00202COL2	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00203COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, NAL, SMX, TET
ZTA17/00315COL1	2017	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00379COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/00380COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00381COL1	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00484COL1	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00485COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/00487COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA17/00489COL1	2017	*E. cloacae*	AMP, AZI, CHL, CIP, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/00489COL2	2017	*E. cloacae*	AMP, AZI, CIP, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/00510COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00531COL1	2017	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00619COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA17/00641COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00641COL2	2017	*C. youngae*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00695COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, FOT, SMX, TET, TMP
ZTA17/00734HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00735HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00762COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET, TMP
ZTA17/00788COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/00790COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00817COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/01007COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01007COL2	2017	*C. youngae*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01017COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, NAL
ZTA17/01023HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01024HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01062HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01063HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01090COL2	2017	*E. asburiae*	AMP, AZI, CHL, CIP, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/01093COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01138COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01176 col8 lact (-)	2017	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA17/01176 col8 lact (+)	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, TET
ZTA17/01176HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01196COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01199COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01201COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01221COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01223COL1	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/01233HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01235COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, NAL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA17/01300COL1	2017	*C. freundii*	AMP, AZI, CIP, COL, NAL, TAZ, TET
ZTA17/01324COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TMP
ZTA17/01363COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA17/01385COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01434COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01579COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01588COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET
ZTA17/01602COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01610 col8 lact(+) colA	2017	*E. coli*	AMP, COL, NAL, TET
ZTA17/01610HEMOLITICO	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01631COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, NAL, TET
ZTA17/01678COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, TET
ZTA17/01678COL2	2017	*C. youngae*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01679COL1	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/01711COL1	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01713COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01746COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01747COL1	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/01748COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01761COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/01777COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, FOT, TAZ, TET
ZTA17/01779COL1	2017	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX
ZTA17/01780COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01782COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01809COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01810COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET
ZTA17/01812COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01813COL1	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/01814COL1	2017	*E. coli*	AMP, SMX, TET, TMP
ZTA17/01815COL1	2017	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TMP

Tabla VII. Distribución de los perfiles de resistencia por especie bacteriana de los aislados del cepario COLR.

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA10/00554RS	2010	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA10/00601RS	2010	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET
ZTA10/01589RS	2010	*E. coli*	COL, TET
ZTA11/01033RS	2011	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA11/02334RS	2011	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA12/01376RS	2012	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA12/01690RS	2012	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, TET
ZTA12/01850BL	2012	*C. freundii*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA12/01862RS	2012	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA12/01903BL	2012	*E. coli*	AMP, COL, TET
ZTA12/01903RS	2012	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA12/01906VD	2012	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, COL, SMX, TET, TMP
ZTA12/01965RS	2012	*E. coli*	AMP, COL, TET
ZTA12/01968BL	2012	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA12/01968RS	2012	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA12/02148RS	2012	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA12/02176RS	2012	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA13/00440BL	2013	*C. freundii*	AMP, AZI, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA13/00440RS	2013	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET, TMP
ZTA13/00456RS	2013	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA13/00481RS	2013	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA13/01258RS	2013	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA13/01378RS	2013	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA13/01379RS	2013	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA13/01536BL	2013	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00235BL	2015	*E. fergusonii*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00235RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/00389BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA15/00389RS	2015	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00401RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00420RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA15/00628BL	2015	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00628RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00630BL	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CIP, COL, NAL, SMX, TET
ZTA15/00630RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET
ZTA15/00630VD	2015	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA15/00631RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA15/00691BL	2015	*E. fergusonii*	AMP, CHL, COL, TET
ZTA15/00691RS	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00691VD	2015	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, COL, FOT, GEN, TET
ZTA15/00735BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX
ZTA15/00735RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET
ZTA15/00750BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, TMP
ZTA15/00750RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00750VD	2015	*K. oxytoca*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00751RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00841BL	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET
ZTA15/00983BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/00983RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, TET
ZTA15/01196BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET
ZTA15/01196RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/01313RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA15/01360RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/01360VD	2015	*K. oxytoca*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/01518BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA15/01518RS	2015	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA15/01704BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/01704RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/01918RS	2015	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA15/01962RS	2015	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA15/02202RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/02333BL	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA15/02333RS	2015	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00198RS	2017	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/00204RS	2017	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/00228RS	2017	*E. coli*	AMP, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA17/00278RS	2017	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/00641BL	2017	*S. enterica*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00641RS	2017	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA17/00830RS	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA17/01593BL	2017	*E. fergusonii*	CIP, COL, TET
ZTA17/01604RS	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TMP
ZTA17/01679RS	2017	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA17/02684BL	2017	*E. coli*	AMP, COL, TET
ZTA17/02684RS	2017	*E. coli*	COL
ZTA17/03056BL	2017	*E. fergusonii*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/01727RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET
ZTA18/01728BL	2018	*C. freundii*	AMP, AZI, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01728RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, SMX, TET
ZTA18/01729RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01732RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/01733RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01738RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA18/01740RS	2018	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01741BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01741RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/01748RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01749RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01750RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01753RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01754RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01755RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01756RS	2018	*E. coli*	COL
ZTA18/01757RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01804RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, NAL, TET
ZTA18/01805RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TMP
ZTA18/01806BL	2018	*E. coli*	AMP, COL, FOT, TAZ, TET, TMP
ZTA18/01806BL	2018	*E. fergusonii*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01807BL	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01807RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TMP
ZTA18/01809RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01811RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01812RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01813BL	2018	*E. asburiae*	AZI, CIP, COL, FOT, GEN, MERO, NAL, SMX, TAZ, TET
ZTA18/01813RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01814RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01815RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL
ZTA18/01816BL	2018	*E. fergusonii*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/01816RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA18/01817RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/01818RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01818VD	2018	*E. asburiae*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01819RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01820RS	2018	*E. coli*	COL, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/01821RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01822RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01824BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01824RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01828BL	2018	*C. freundii*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01828RS	2018	*E. coli*	CIP, COL, SMX, TET
ZTA18/01829BL	2018	*E. coli*	CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01829RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/01830RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01830VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/01832BL	2018	*E. fergusonii*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01832RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01833RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01834RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TMP
ZTA18/01835RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01836BL	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01836RS	2018	*E. coli*	AMP, COL
ZTA18/01857RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01858VD	2018	*K. oxytoca*	AMP, CIP, COL, SMX, TET
ZTA18/01859RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01860RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01861BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, GEN, SMX, TAZ, TET
ZTA18/01861RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01862RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01863RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TMP
ZTA18/01869RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01870BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA18/01870RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01871RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01872BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA18/01872RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET
ZTA18/01873RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01874RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/01890BL	2018	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/01890RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET
ZTA18/01891BL	2018	*E. fergusonii*	COL
ZTA18/01891RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01892RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01893RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/01897RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01898RS	2018	*E. coli*	COL, TET
ZTA18/01919RS	2018	*E. coli*	CIP, COL
ZTA18/01919VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01920RS	2018	*E. coli*	CIP, COL
ZTA18/01920VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TGC, TMP
ZTA18/01921RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, TET, TMP
ZTA18/01921VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, COL, TET
ZTA18/01923RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01924BL	2018	*E. coli*	COL, TET
ZTA18/01924RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX
ZTA18/01939RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01940RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01941RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01944VD	2018	*K. pneumoniae*	AZI, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01945RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01945VD	2018	*C. freundii*	AMP, CHL, CIP, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01946RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01947RS	2018	*E. coli*	COL, TET
ZTA18/01948RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01979RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/01981BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA18/01981RS	2018	*E. coli*	CIP, COL, NAL
ZTA18/01982RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, TET
ZTA18/01984RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02038RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02039BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET
ZTA18/02039RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02040RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02041RS	2018	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02042RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02043RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02044RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02045RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02046BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02046RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02046VD	2018	*A. hydrophila*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, MERO, NAL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA18/02047RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, TET, TMP
ZTA18/02048BL	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/02048RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02048VD	2018	*R. ornithinolytica*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02049BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02049RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02050RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02051RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET
ZTA18/02052BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, FOT, SMX, TAZ, TMP
ZTA18/02052RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02053RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02055RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02084BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02084RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA18/02085RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02087BL	2018	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET
ZTA18/02087RS	2018	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02088RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TMP
ZTA18/02089RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, SMX, TET
ZTA18/02089VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02090RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02091BL	2018	*C. braakii*	AMP, CIP, COL, GEN, SMX, TET
ZTA18/02091RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02091VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, COL, SMX, TET
ZTA18/02092RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02093BL	2018	*E. fergusonii*	CHL, CIP, COL, GEN
ZTA18/02093RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02094RS	2018	*E. coli*	CIP, COL
ZTA18/02095RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02096RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02096VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02097RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02098RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02099RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02100RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02107BL	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02107RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02108RS	2018	*E. coli*	CIP, COL, TET
ZTA18/02109RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX
ZTA18/02110RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02110VD	2018	*E. asburiae*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02145BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/02146BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02146RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02147RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02148BL	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02148RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02161VD	2018	*R. ornithinolytica*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02163RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02163VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CIP, COL, NAL
ZTA18/02164RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02165RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02166RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02174RS	2018	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TMP
ZTA18/02174VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET
ZTA18/02188BL	2018	*E. coli*	AMP, COL, TET
ZTA18/02188RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, TET
ZTA18/02189RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET
ZTA18/02190BL	2018	*C. freundii*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02191RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02219BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET
ZTA18/02223RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02225RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02226RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02228BL	2018	*C. amalonaticus*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02228RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02314BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL
ZTA18/02314RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02315BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02315RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET
ZTA18/02316RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02317RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02318RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02320RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02321RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02322RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, GEN, TET, TMP
ZTA18/02323RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02323VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02324RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02325RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/02326RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, GEN
ZTA18/02327RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02328RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02328VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02329RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02330RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02331RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02339RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA18/02339VD	2018	*E. cloacae*	AMP, AZI, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02340BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA18/02340RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02341RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET
ZTA18/02342RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02344RS	2018	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02345BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02346RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET
ZTA18/02350RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET
ZTA18/02351VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02352RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TMP
ZTA18/02353RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02354RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, TET
ZTA18/02355BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02355RS	2018	*E. coli*	COL, TMP
ZTA18/02356RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02357RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02365RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02366RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02367BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02367RS	2018	*E. coli*	COL
ZTA18/02368RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02394RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02396RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, FOT, GEN, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02397RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, FOT, GEN, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02400RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02401RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02403RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/02404BL	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02404RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, TAZ
ZTA18/02406VD	2018	*E. cloacae*	COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02407RS	2018	*E. coli*	COL
ZTA18/02408VD	2018	*E. cloacae*	AMP, COL
ZTA18/02476BL	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02476RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02476VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, CHL, COL, GEN, TET
ZTA18/02477RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02477VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02478RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02479BL	2018	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02479RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02480RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02481VD	2018	*R. ornithinolytica*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02483RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA18/02485RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02486BL	2018	*C. freundii*	AMP, AZI, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02486RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TMP
ZTA18/02487RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, GEN, TAZ, TET
ZTA18/02488RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02489RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02490RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02491BL	2018	*C. freundii*	AMP, CIP, COL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02491RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02492RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL
ZTA18/02493RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02494RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02496RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02497RS	2018	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02509RS	2018	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02509VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA18/02510VD	2018	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02511RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02512RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA18/02513RS	2018	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02514RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02515RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA18/02515VD	2018	*R. ornithinolytica*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02516BL	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET
ZTA18/02516VD	2018	*R. ornithinolytica*	AMP, CIP, COL, NAL, TET
ZTA18/02517RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02518RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02519RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02559RS	2018	*E. coli*	CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02560RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02561RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA18/02563BL	2018	*A. hydrophila*	AMP, AZI, CIP, COL, FOT, GEN, MERO, NAL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA18/02563RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA18/02576RS	2018	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET
ZTA18/02577RS	2018	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, TET, TMP
ZTA18/02578VD	2018	*R. ornithinolytica*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00414RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00424RS	2019	*E. coli*	CHL, COL, GEN, SMX, TMP
ZTA19/00457RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/00463RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00463VD	2019	*A. hydrophila*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, MERO, NAL, SMX, TET, TGC, TMP
ZTA19/00464BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA19/00464RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TMP
ZTA19/00466BL	2019	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TMP
ZTA19/00466RS	2019	*E. coli*	COL
ZTA19/00467RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, TET, TMP
ZTA19/00467VD	2019	*C. youngae*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA19/00468RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TMP
ZTA19/00469RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00474VD	2019	*E. asburiae*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA19/00475RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00477RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00478RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA19/00479BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00479RS	2019	*E. coli*	COL, SMX, TET
ZTA19/00480RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, TET, TMP
ZTA19/00485RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00488RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00506RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00528BL	2019	*C. freundii*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA19/00528RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00529RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00530BL	2019	*E. coli*	CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00530RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00560BL	2019	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET
ZTA19/00560RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, SMX, TET
ZTA19/00611RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN
ZTA19/00612RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00613RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00614RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL
ZTA19/00616VD	2019	*R. ornithinolytica*	AMP, CIP, COL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA19/00617BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET
ZTA19/00617RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/00618RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00619RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00621RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA19/00622RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00624RS	2019	*E. coli*	CIP, COL
ZTA19/00625RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00625VD	2019	*R. ornithinolytica*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00634RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/00676RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00677RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00678RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00690RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL
ZTA19/00691RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA19/00692RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA19/00693RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA19/00697RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00697VD	2019	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA19/00698RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET
ZTA19/00699RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00720RS	2019	*E. coli*	AZI, COL, SMX, TMP
ZTA19/00721RS	2019	*E. coli*	AZI, COL, SMX, TMP
ZTA19/00731BL	2019	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00731RS	2019	*E. coli*	COL, TET
ZTA19/00852RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00853RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, TET

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA19/00854RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00898RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL
ZTA19/00899BL	2019	*P. aerogenes*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET, TMP
ZTA19/00900VD	2019	*K. pneumoniae*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET
ZTA19/00902RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA19/00950VD	2019	*K. pneumoniae*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TMP
ZTA19/00952RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00953BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00953RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00954RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00956RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/00958RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/00959RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, TAZ
ZTA19/00960BL	2019	*E. coli*	CIP, COL, SMX
ZTA19/01007RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01007VD	2019	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01008BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01008RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET
ZTA19/01008VD	2019	*R. ornithinolytica*	AMP, CHL, COL, SMX, TAZ, TET
ZTA19/01010RS	2019	*E. coli*	COL, GEN, SMX, TET
ZTA19/01012RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, FOT, SMX, TAZ
ZTA19/01013BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01013RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01014RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01017RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01019RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01096RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET
ZTA19/01126RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01128RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01161RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA19/01162RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01163RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/01210RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01256BL	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET
ZTA19/01256RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, TET
ZTA19/01258RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01262BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01265RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET
ZTA19/01268RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01269RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, TAZ
ZTA19/01271RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01273VD	2019	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, COL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA19/01274RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/01275RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01276RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01277RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET, TMP
ZTA19/01280RS	2019	*E. coli*	CIP, COL, GEN, SMX, TMP
ZTA19/01285RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA19/01286RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, TET
ZTA19/01386RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, COL, SMX, TET
ZTA19/01474RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET
ZTA19/01475RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CIP, COL, NAL, TET
ZTA19/01476VD	2019	*R. ornithinolytica*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01479RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01480RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01481BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01481RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01482RS	2019	*E. coli*	CIP, COL, NAL
ZTA19/01483BL	2019	*E. coli*	COL, TET
ZTA19/01484RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01485RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/01488BL	2019	*E. coli*	CIP, COL, SMX
ZTA19/01488RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET, TMP
ZTA19/01488VD	2019	*E. cloacae*	AMP, AZI, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA19/01494RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA19/01496BL	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET
ZTA19/01496RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01500RS	2019	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA19/01502RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01522RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01536RS	2019	*E. coli*	COL, TET
ZTA19/01557RS	2019	*E. coli*	CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01561RS	2019	*E. coli*	COL
ZTA19/01562RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA19/01569RS	2019	*E. coli*	CIP, COL, NAL, TET, TMP
ZTA19/01574RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, SMX, TET, TMP
ZTA19/01576RS	2019	*E. coli*	COL
ZTA19/01584VD	2019	*C. youngae*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01586RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01588RS	2019	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01589RS	2019	*E. coli*	CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA19/01590RS	2019	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01593RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA19/01607RS	2019	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA21/00096RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00116RS	2021	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00117RS	2021	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00126RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA21/00141RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00143RS	2021	*E. coli*	CIP, COL
ZTA21/00152VD	2021	*E. cloacae*	AZI, CIP, COL, NAL
ZTA21/00173RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00184BL	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, TET, TMP
ZTA21/00184RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TMP
ZTA21/00185RS	2021	*E. coli*	CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00187RS	2021	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00204RS	2021	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TMP
ZTA21/00206RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TMP
ZTA21/00210RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET
ZTA21/00255VD	2021	*R. ornithinolytica*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA21/00260VD	2021	*R. ornithinolytica*	AMP, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA21/00263RS	2021	*E. coli*	COL
ZTA21/00263VD	2021	*K. pneumoniae*	AMP, AZI, CIP, COL
ZTA21/00264RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00266RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00269RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA21/00271RS	2021	*E. coli*	AMP, AZI, CHL, CIP, COL, TET, TMP
ZTA21/00273VD	2021	*E. asburiae*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET
ZTA21/00291RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00293RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00311RS	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00315RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00317RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00329RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA21/00338RS	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00342RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TMP
ZTA21/00344RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA21/00345RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP

Referencia	Año	Especie bacteriana	Perfil de resistencia
ZTA21/00346RS	2021	*E. coli*	CIP, COL
ZTA21/00348RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00349RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00352RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TMP
ZTA21/00380RS	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, TMP
ZTA21/00396RS	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, NAL, SMX, TET
ZTA21/00398RS	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, TET
ZTA21/00411RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, TET, TMP
ZTA21/00412RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, GEN, SMX, TET, TMP
ZTA21/00415RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, SMX, TET, TMP
ZTA21/00416RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL
ZTA21/00417RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, COL, GEN, TET, TMP
ZTA21/00418RS	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, FOT, NAL, SMX, TAZ, TET, TMP
ZTA21/00419RS	2021	*E. coli*	AMP, COL, SMX, TMP
ZTA21/00420RS	2021	*E. coli*	AMP, CIP, COL, GEN, NAL, TMP
ZTA21/00421RS	2021	*E. coli*	AMP, CHL, CIP, COL, SMX, TET, TMP

Anexo IV. Distribución de los resultados de cuantificación por qPCR a tiempo real del gen *mcr-1* en muestras de contenido cecal de ganado porcino por año de muestreo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA98/00006	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00008	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00016	Congelado	1998	1,58E+01	3,13E+03	3,50	Negativo
ZTA98/00065	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00074	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00101	Congelado	1998	1,85E+01	3,66E+03	3,56	Negativo
ZTA98/00115	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00117	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00122	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00125	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00129	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00132	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00136	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00139	Congelado	1998	1,24E+01	1,96E+02	2,30	Negativo
ZTA98/00142	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00146	Congelado	1998	3,84E+01	6,08E+02	2,78	Negativo
ZTA98/00161	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00175	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00202	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00214	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00227	Congelado	1998	2,75E+01	4,36E+02	2,64	Negativo
ZTA98/00235	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00236	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00239	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00252	Congelado	1998	1,47E+01	2,91E+03	3,46	Negativo
ZTA98/00270	Congelado	1998	1,32E+01	2,09E+02	2,32	Negativo
ZTA98/00272	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00291	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00296	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00354	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00382	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00399	Congelado	1998	2,87E+01	5,68E+03	3,75	Negativo
ZTA98/00530	Congelado	1998	4,00E+01	7,92E+03	3,90	Negativo
ZTA98/00540	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00561	Congelado	1998	3,22E+01	6,37E+03	3,80	Negativo
ZTA98/00578	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00583	Congelado	1998	3,00E+01	5,94E+03	3,77	Negativo
ZTA98/00586	Congelado	1998	1,10E+01	2,18E+03	3,34	Negativo
ZTA98/00587	Congelado	1998	1,56E+01	2,47E+02	2,39	Negativo
ZTA98/00611	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00632	Congelado	1998	4,03E+01	6,38E+02	2,81	Negativo
ZTA98/00807	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA98/00815	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00817	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00823	Congelado	1998	1,53E+01	2,42E+02	2,39	Negativo
ZTA98/00835	Congelado	1998	4,38E+01	6,94E+02	2,84	Negativo
ZTA98/00844	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00862	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00899	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA98/00900	Congelado	1998	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/102	Congelado	2002	1,61E+01	3,19E+03	3,50	Negativo
P2/103	Congelado	2002	1,92E+01	3,80E+03	3,58	Negativo
P2/104	Congelado	2002	1,97E+00	3,90E+02	2,59	Negativo
P2/108	Congelado	2002	1,10E+01	2,18E+03	3,34	Negativo
P2/111	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/119	Congelado	2002	1,30E+00	2,57E+02	2,41	Negativo
P2/164	Congelado	2002	3,23E+01	6,39E+03	3,81	Negativo
P2/171	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/178	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/180	Congelado	2002	3,21E+00	6,35E+02	2,80	Negativo
P2/193	Congelado	2002	8,93E+00	1,77E+03	3,25	Negativo
P2/197	Congelado	2002	4,59E+00	9,09E+02	2,96	Negativo
P2/201	Congelado	2002	2,32E+01	4,59E+03	3,66	Negativo
P2/204	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/214	Congelado	2002	1,46E+01	2,89E+03	3,46	Negativo
P2/216	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/221	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/228	Congelado	2002	2,12E+01	4,20E+03	3,62	Negativo
P2/231	Congelado	2002	2,59E+01	5,13E+03	3,71	Negativo
P2/235	Congelado	2002	1,14E+01	2,26E+03	3,35	Negativo
P2/245	Congelado	2002	3,71E+01	7,34E+03	3,87	Negativo
P2/336	Congelado	2002	2,05E+01	4,06E+03	3,61	Negativo
P2/345	Congelado	2002	1,56E+01	3,09E+03	3,49	Negativo
P2/349	Congelado	2002	3,65E+00	7,23E+02	2,86	Negativo
P2/350	Congelado	2002	3,10E+00	6,14E+02	2,79	Negativo
P2/354	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/360	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/374	Congelado	2002	1,08E+00	2,14E+02	2,33	Negativo
P2/382	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/386	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/41	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/414	Congelado	2002	1,32E+01	2,61E+03	3,42	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
P2/415	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/423	Congelado	2002	4,66E+00	9,22E+02	2,97	Negativo
P2/430	Congelado	2002	1,53E+00	3,03E+02	2,48	Negativo
P2/438	Congelado	2002	1,60E+01	3,17E+03	3,50	Negativo
P2/439	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/443	Congelado	2002	1,33E+00	2,63E+02	2,42	Negativo
P2/461	Congelado	2002	1,01E+00	2,00E+02	2,30	Negativo
P2/468	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/478	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/484	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/486	Congelado	2002	3,83E+00	7,58E+02	2,88	Negativo
P2/497	Congelado	2002	2,97E+00	5,88E+02	2,77	Negativo
P2/562	Congelado	2002	1,53E+00	3,03E+02	2,48	Negativo
P2/563	Congelado	2002	2,81E+00	5,56E+02	2,75	Negativo
P2/626	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/634	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P2/637	Congelado	2002	4,18E+00	8,27E+02	2,92	Negativo
P2/641	Congelado	2002	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P4/1231	Congelado	2004	2,78E+01	5,50E+03	3,74	Negativo
P4/1234	Congelado	2004	4,67E+01	9,24E+03	3,97	Negativo
P4/1235	Congelado	2004	4,08E+01	8,08E+03	3,91	Negativo
P4/1239	Congelado	2004	3,90E+01	7,72E+03	3,89	Negativo
P4/1243	Congelado	2004	1,08E+01	2,14E+03	3,33	Negativo
P4/1604	Congelado	2004	4,83E+01	9,56E+03	3,98	Negativo
P4/1613	Congelado	2004	1,54E+01	3,05E+03	3,48	Negativo
P4/1624	Congelado	2004	3,26E+02	6,45E+04	4,81	Positivo
P4/1632	Congelado	2004	5,61E+01	1,11E+04	4,05	Negativo
P4/1860	Congelado	2004	7,07E+02	1,40E+05	5,15	Positivo
P4/1863	Congelado	2004	9,18E+01	1,82E+04	4,26	Negativo
P4/1864	Congelado	2004	5,87E+01	1,16E+04	4,07	Negativo
P4/1875	Congelado	2004	5,68E+01	1,12E+04	4,05	Negativo
P4/1879	Congelado	2004	1,31E+01	2,59E+03	3,41	Negativo
P4/1883	Congelado	2004	2,88E+02	5,70E+04	4,76	Positivo
P4/1884	Congelado	2004	8,36E+02	1,65E+05	5,22	Positivo
P4/1887	Congelado	2004	1,77E+01	3,50E+03	3,54	Negativo
P4/1888	Congelado	2004	2,51E+01	4,97E+03	3,70	Negativo
P4/1891	Congelado	2004	9,99E+00	1,98E+03	3,30	Negativo
P4/1892	Congelado	2004	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P4/1895	Congelado	2004	1,47E+01	2,91E+03	3,46	Negativo
P4/1896	Congelado	2004	1,35E+02	2,67E+04	4,43	Positivo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
P4/1899	Congelado	2004	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P4/1900	Congelado	2004	2,61E+01	5,17E+03	3,71	Negativo
P4/1903	Congelado	2004	2,15E+02	4,26E+04	4,63	Positivo
P4/1904	Congelado	2004	6,60E+00	1,31E+03	3,12	Negativo
P4/1907	Congelado	2004	3,96E+01	7,84E+03	3,89	Negativo
P4/1908	Congelado	2004	6,97E+01	1,38E+04	4,14	Negativo
P4/1912	Congelado	2004	2,26E+01	4,47E+03	3,65	Negativo
P4/1915	Congelado	2004	1,47E+01	2,91E+03	3,46	Negativo
P4/1919	Congelado	2004	2,16E+02	4,28E+04	4,63	Positivo
P4/1920	Congelado	2004	8,47E+01	1,68E+04	4,22	Negativo
P4/1924	Congelado	2004	5,48E+01	1,08E+04	4,04	Negativo
P4/1927	Congelado	2004	5,83E+01	1,15E+04	4,06	Negativo
P4/1931	Congelado	2004	5,34E+02	1,06E+05	5,02	Positivo
P4/1932	Congelado	2004	2,21E+01	4,37E+03	3,64	Negativo
P4/1935	Congelado	2004	2,39E+01	4,73E+03	3,68	Negativo
P4/2004	Congelado	2004	4,62E+01	9,15E+03	3,96	Negativo
P4/2009	Congelado	2004	2,33E+00	4,61E+02	2,66	Negativo
P4/2013	Congelado	2004	1,76E+01	3,48E+03	3,54	Negativo
P4/2016	Congelado	2004	1,47E+01	2,91E+03	3,46	Negativo
P4/2021	Congelado	2004	2,52E+01	4,99E+03	3,70	Negativo
P4/2024	Congelado	2004	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P4/2068	Congelado	2004	1,42E+01	2,81E+03	3,45	Negativo
P4/2084	Congelado	2004	3,51E+00	6,95E+02	2,84	Negativo
P4/2088	Congelado	2004	4,43E+01	8,77E+03	3,94	Negativo
P4/2089	Congelado	2004	1,46E+01	2,89E+03	3,46	Negativo
P4/2097	Congelado	2004	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
P4/2482	Congelado	2004	2,53E+00	5,01E+02	2,70	Negativo
P4/2483	Congelado	2004	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00626	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00629	Congelado	2006	2,11E+00	4,18E+02	2,62	Negativo
VE06/00632	Congelado	2006	2,25E+01	4,45E+03	3,65	Negativo
VE06/00633	Congelado	2006	2,12E+01	4,20E+03	3,62	Negativo
VE06/00641	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00645	Congelado	2006	2,12E+00	4,20E+02	2,62	Negativo
VE06/00665	Congelado	2006	9,25E+02	1,83E+05	5,26	Positivo
VE06/00667	Congelado	2006	4,55E+01	9,01E+03	3,95	Negativo
VE06/00674	Congelado	2006	3,06E+00	6,06E+02	2,78	Negativo
VE06/00677	Congelado	2006	4,61E+00	9,13E+02	2,96	Negativo
VE06/00679	Congelado	2006	1,57E+02	3,11E+04	4,49	Positivo
VE06/00681	Congelado	2006	1,05E+02	2,08E+04	4,32	Positivo
VE06/00684	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00686	Congelado	2006	1,41E+01	2,79E+03	3,45	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
VE06/00688	Congelado	2006	3,57E+01	7,07E+03	3,85	Negativo
VE06/00697	Congelado	2006	8,46E+00	1,67E+03	3,22	Negativo
VE06/00699	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00702	Congelado	2006	2,07E+01	4,10E+03	3,61	Negativo
VE06/00703	Congelado	2006	5,34E+01	1,06E+04	4,02	Negativo
VE06/00704	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00710	Congelado	2006	1,92E+01	3,80E+03	3,58	Negativo
VE06/00711	Congelado	2006	1,94E+01	3,84E+03	3,58	Negativo
VE06/00728	Congelado	2006	9,37E+00	1,85E+03	3,27	Negativo
VE06/00730	Congelado	2006	3,50E+00	6,93E+02	2,84	Negativo
VE06/00732	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00741	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/00744	Congelado	2006	4,08E+01	8,08E+03	3,91	Negativo
VE06/00745	Congelado	2006	3,12E+00	6,18E+02	2,79	Negativo
VE06/00747	Congelado	2006	5,45E+01	1,08E+04	4,03	Negativo
VE06/00832	Congelado	2006	5,53E+00	1,09E+03	3,04	Negativo
VE06/00981	Congelado	2006	2,17E+01	4,30E+03	3,63	Negativo
VE06/00984	Congelado	2006	1,14E+01	2,26E+03	3,35	Negativo
VE06/00992	Congelado	2006	1,81E+01	3,58E+03	3,55	Negativo
VE06/00994	Congelado	2006	1,12E+01	2,22E+03	3,35	Negativo
VE06/00995	Congelado	2006	1,70E+01	3,37E+03	3,53	Negativo
VE06/00998	Congelado	2006	9,68E+00	1,92E+03	3,28	Negativo
VE06/00999	Congelado	2006	8,74E+00	1,73E+03	3,24	Negativo
VE06/01001	Congelado	2006	1,81E+01	3,58E+03	3,55	Negativo
VE06/01006	Congelado	2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE06/01749	Congelado	2006	2,91E+01	5,76E+03	3,76	Negativo
VE06/01750	Congelado	2006	1,32E+02	2,61E+04	4,42	Positivo
VE06/01752	Congelado	2006	2,94E+01	5,82E+03	3,76	Negativo
VE06/01753	Congelado	2006	2,48E+01	4,91E+03	3,69	Negativo
VE06/01758	Congelado	2006	1,54E+01	3,05E+03	3,48	Negativo
VE06/01762	Congelado	2006	3,96E+01	7,84E+03	3,89	Negativo
VE06/01767	Congelado	2006	1,32E+01	2,61E+03	3,42	Negativo
VE06/01769	Congelado	2006	1,25E+01	2,47E+03	3,39	Negativo
VE06/01772	Congelado	2006	6,46E+00	1,28E+03	3,11	Negativo
VE06/01773	Congelado	2006	9,13E+02	1,81E+05	5,26	Positivo
VE06/01779	Congelado	2006	1,91E+01	3,78E+03	3,58	Negativo
VE08/00877	Congelado	2008	2,05E+01	4,06E+03	3,61	Negativo
VE08/00881	Congelado	2008	9,44E+00	1,87E+03	3,27	Negativo
VE08/00883	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/00894	Congelado	2008	1,04E+01	2,06E+03	3,31	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
VE08/00897	Congelado	2008	2,04E+00	4,04E+02	2,61	Negativo
VE08/00911	Congelado	2008	2,33E+02	4,61E+04	4,66	Positivo
VE08/00913	Congelado	2008	3,20E+03	6,33E+05	5,80	Positivo
VE08/00918	Congelado	2008	3,76E+03	7,44E+05	5,87	Positivo
VE08/00919	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/00922	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/00926	Congelado	2008	1,16E+03	2,30E+05	5,36	Positivo
VE08/00927	Congelado	2008	1,93E+02	3,82E+04	4,58	Positivo
VE08/01586	Congelado	2008	1,29E+02	2,55E+04	4,41	Positivo
VE08/01587	Congelado	2008	1,96E+03	3,88E+05	5,59	Positivo
VE08/01591	Congelado	2008	1,15E+03	2,28E+05	5,36	Positivo
VE08/01592	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/01593	Congelado	2008	8,88E+02	1,76E+05	5,24	Positivo
VE08/01601	Congelado	2008	6,06E+01	1,20E+04	4,08	Negativo
VE08/01603	Congelado	2008	8,02E+01	1,59E+04	4,20	Negativo
VE08/02953	Congelado	2008	6,27E+01	1,24E+04	4,09	Negativo
VE08/02955	Congelado	2008	2,91E+02	5,76E+04	4,76	Positivo
VE08/02956	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/02958	Congelado	2008	9,26E+02	1,83E+05	5,26	Positivo
VE08/02959	Congelado	2008	4,02E+03	7,96E+05	5,90	Positivo
VE08/02962	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/02985	Congelado	2008	3,30E+01	6,53E+03	3,82	Negativo
VE08/02994	Congelado	2008	1,77E+00	3,50E+02	2,55	Negativo
VE08/02995	Congelado	2008	8,54E+01	1,69E+04	4,23	Negativo
VE08/02996	Congelado	2008	4,53E+01	8,97E+03	3,95	Negativo
VE08/02998	Congelado	2008	5,68E+03	1,12E+06	6,05	Positivo
VE08/03067	Congelado	2008	1,44E+02	2,85E+04	4,45	Positivo
VE08/03069	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03071	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03077	Congelado	2008	9,69E+00	1,92E+03	3,28	Negativo
VE08/03079	Congelado	2008	5,92E+00	1,17E+03	3,07	Negativo
VE08/03080	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03082	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03083	Congelado	2008	5,10E+00	1,01E+03	3,00	Negativo
VE08/03084	Congelado	2008	8,85E+02	1,75E+05	5,24	Positivo
VE08/03092	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03095	Congelado	2008	2,94E+00	5,82E+02	2,77	Negativo
VE08/03146	Congelado	2008	5,70E+00	1,13E+03	3,05	Negativo
VE08/03147	Congelado	2008	1,97E+01	3,90E+03	3,59	Negativo
VE08/03149	Congelado	2008	1,67E+01	3,31E+03	3,52	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
VE08/03173	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03174	Congelado	2008	1,82E+02	3,60E+04	4,56	Positivo
VE08/03175	Congelado	2008	3,84E+01	7,60E+03	3,88	Negativo
VE08/03177	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03180	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
VE08/03192	Congelado	2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/00554	Congelado	2010	8,42E+02	1,33E+04	4,13	Positivo
ZTA10/00587	Congelado	2010	1,76E+01	2,79E+02	2,45	Negativo
ZTA10/00601	Congelado	2010	1,47E+03	2,33E+04	4,37	Positivo
ZTA10/00716	Congelado	2010	2,23E+01	4,41E+03	3,64	Negativo
ZTA10/00718	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/00886	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/00933	Congelado	2010	2,08E+02	4,12E+04	4,61	Positivo
ZTA10/00965	Congelado	2010	3,27E+02	6,47E+04	4,81	Positivo
ZTA10/01011	Congelado	2010	1,07E+02	2,12E+04	4,33	Positivo
ZTA10/01059	Congelado	2010	2,47E+02	4,89E+04	4,69	Positivo
ZTA10/01060	Congelado	2010	1,66E+02	3,29E+04	4,52	Positivo
ZTA10/01065	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/01100	Congelado	2010	3,74E+01	7,40E+03	3,87	Negativo
ZTA10/01115	Congelado	2010	5,33E+02	1,06E+05	5,02	Positivo
ZTA10/01116	Congelado	2010	2,71E+01	5,36E+03	3,73	Negativo
ZTA10/01142	Congelado	2010	1,03E+02	2,04E+04	4,31	Positivo
ZTA10/01164	Congelado	2010	1,63E+02	3,23E+04	4,51	Positivo
ZTA10/01165	Congelado	2010	4,31E+01	8,53E+03	3,93	Negativo
ZTA10/01201	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/01261	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/01396	Congelado	2010	4,11E+01	8,14E+03	3,91	Negativo
ZTA10/01416	Congelado	2010	5,59E+01	1,11E+04	4,04	Negativo
ZTA10/01458	Congelado	2010	1,57E+03	3,11E+05	5,49	Positivo
ZTA10/01537	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/01589	Congelado	2010	1,73E+03	3,42E+05	5,53	Positivo
ZTA10/01620	Congelado	2010	1,49E+01	2,95E+03	3,47	Negativo
ZTA10/01621	Congelado	2010	2,10E+02	4,16E+04	4,62	Positivo
ZTA10/01623	Congelado	2010	4,95E+02	9,80E+04	4,99	Positivo
ZTA10/01624	Congelado	2010	2,61E+02	5,17E+04	4,71	Positivo
ZTA10/01625	Congelado	2010	2,54E+02	5,03E+04	4,70	Positivo
ZTA10/01703	Congelado	2010	8,32E+01	1,65E+04	4,22	Negativo
ZTA10/01773	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/01836	Congelado	2010	7,60E+01	1,50E+04	4,18	Negativo
ZTA10/01887	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA10/01918	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/02094	Congelado	2010	2,66E+02	5,27E+04	4,72	Positivo
ZTA10/02170	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA10/02208	Congelado	2010	1,16E+01	2,30E+03	3,36	Negativo
ZTA10/02210	Congelado	2010	2,49E+03	4,93E+05	5,69	Positivo
ZTA10/02211	Congelado	2010	2,62E+01	5,19E+03	3,71	Negativo
ZTA10/02212	Congelado	2010	3,89E+01	7,70E+03	3,89	Negativo
ZTA10/02320	Congelado	2010	1,27E+02	2,51E+04	4,40	Positivo
ZTA10/02343	Congelado	2010	4,10E+01	8,12E+03	3,91	Negativo
ZTA10/02344	Congelado	2010	7,62E+02	1,51E+05	5,18	Positivo
ZTA10/02346	Congelado	2010	4,90E+01	9,70E+03	3,99	Negativo
ZTA10/02347	Congelado	2010	1,54E+03	3,05E+05	5,48	Positivo
ZTA10/02348	Congelado	2010	3,47E+01	6,87E+03	3,84	Negativo
ZTA10/02352	Congelado	2010	3,35E+02	6,63E+04	4,82	Positivo
ZTA10/02492	Congelado	2010	1,34E+01	2,65E+03	3,42	Negativo
ZTA10/02640	Congelado	2010	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/00605	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/00624	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/00625	Congelado	2011	6,22E+03	1,23E+06	6,09	Positivo
ZTA11/00626	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/00627	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/00688	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/00960	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/00978	Congelado	2011	4,11E+02	8,14E+04	4,91	Positivo
ZTA11/00979	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01033	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01036	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01064	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01121	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01352	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01356	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01454	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01456	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01490	Congelado	2011	4,35E+02	8,61E+04	4,94	Positivo
ZTA11/01558	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01559	Congelado	2011	1,08E+02	2,14E+04	4,33	Positivo
ZTA11/01561	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01563	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01596	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/01860	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA11/01915	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02105	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02171	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02334	Congelado	2011	5,30E+02	1,05E+05	5,02	Positivo
ZTA11/02336	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02466	Congelado	2011	1,08E+02	2,14E+04	4,33	Positivo
ZTA11/02487	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02731	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02734	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02838	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/02841	Congelado	2011	1,05E+02	2,08E+04	4,32	Positivo
ZTA11/03281	Congelado	2011	1,88E+02	3,72E+04	4,57	Positivo
ZTA11/03328	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03387	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03408	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03425	Congelado	2011	1,28E+02	2,53E+04	4,40	Positivo
ZTA11/03426	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03427	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03428	Congelado	2011	1,28E+02	2,53E+04	4,40	Positivo
ZTA11/03457	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03494	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03495	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03659	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03721	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03723	Congelado	2011	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA11/03859	Congelado	2011	5,10E+02	1,01E+05	5,00	Positivo
ZTA12/01079	Congelado	2012	9,44E+01	1,87E+04	4,27	Negativo
ZTA12/01216	Congelado	2012	1,66E+01	3,29E+03	3,52	Negativo
ZTA12/01294	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01325	Congelado	2012	2,38E+01	4,71E+03	3,67	Negativo
ZTA12/01331	Congelado	2012	1,31E+02	2,59E+04	4,41	Positivo
ZTA12/01332	Congelado	2012	2,20E+02	4,36E+04	4,64	Positivo
ZTA12/01349	Congelado	2012	5,09E+01	1,01E+04	4,00	Negativo
ZTA12/01359	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01376	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01433	Congelado	2012	1,29E+02	2,55E+04	4,41	Positivo
ZTA12/01441	Congelado	2012	5,33E+02	1,06E+05	5,02	Positivo
ZTA12/01443	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01456	Congelado	2012	3,11E+01	6,16E+03	3,79	Negativo
ZTA12/01481	Congelado	2012	1,02E+01	2,02E+03	3,31	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA12/01482	Congelado	2012	2,30E+02	4,55E+04	4,66	Positivo
ZTA12/01486	Congelado	2012	2,71E+01	5,36E+03	3,73	Negativo
ZTA12/01560	Congelado	2012	9,27E+01	1,84E+04	4,26	Negativo
ZTA12/01659	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01688	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01690	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01704	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01706	Congelado	2012	6,24E+01	1,24E+04	4,09	Negativo
ZTA12/01722	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01793	Congelado	2012	1,04E+02	2,06E+04	4,31	Positivo
ZTA12/01828	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01850	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01852	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01862	Congelado	2012	3,13E+01	6,20E+03	3,79	Negativo
ZTA12/01893	Congelado	2012	6,33E+01	1,25E+04	4,10	Negativo
ZTA12/01894	Congelado	2012	8,95E+02	1,77E+05	5,25	Positivo
ZTA12/01895	Congelado	2012	5,66E+01	1,12E+04	4,05	Negativo
ZTA12/01903	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01904	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01906	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01917	Congelado	2012	1,00E+02	1,98E+04	4,30	Positivo
ZTA12/01965	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/01968	Congelado	2012	2,13E+01	4,22E+03	3,63	Negativo
ZTA12/02021	Congelado	2012	1,10E+02	2,18E+04	4,34	Positivo
ZTA12/02132	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/02148	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/02151	Congelado	2012	1,06E+02	2,10E+04	4,32	Positivo
ZTA12/02162	Congelado	2012	1,80E+01	3,56E+03	3,55	Negativo
ZTA12/02163	Congelado	2012	1,19E+02	2,36E+04	4,37	Positivo
ZTA12/02176	Congelado	2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA12/02215	Congelado	2012	3,66E+02	7,25E+04	4,86	Positivo
ZTA12/02226	Congelado	2012	1,73E+02	3,42E+04	4,53	Positivo
ZTA12/02230	Congelado	2012	1,52E+01	3,01E+03	3,48	Negativo
ZTA12/02231	Congelado	2012	1,26E+02	2,49E+04	4,40	Positivo
ZTA12/02335	Congelado	2012	1,56E+02	3,09E+04	4,49	Positivo
ZTA12/02337	Congelado	2012	1,95E+02	3,86E+04	4,59	Positivo
ZTA13/00261	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/00282	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/00395	Congelado	2013	1,64E+02	3,25E+04	4,51	Positivo
ZTA13/00433	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA13/00434	Congelado	2013	4,05E+02	8,02E+04	4,90	Positivo
ZTA13/00440	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/00451	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/00452	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/00456	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/00469	Congelado	2013	9,70E+01	1,92E+04	4,28	Negativo
ZTA13/00470	Congelado	2013	2,17E+02	4,30E+04	4,63	Positivo
ZTA13/00481	Congelado	2013	2,11E+01	4,18E+03	3,62	Negativo
ZTA13/00503	Congelado	2013	4,24E+00	8,39E+02	2,92	Negativo
ZTA13/00513	Congelado	2013	7,62E+01	1,51E+04	4,18	Negativo
ZTA13/00515	Congelado	2013	1,87E+02	3,70E+04	4,57	Positivo
ZTA13/00623	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/00729	Congelado	2013	1,21E+01	2,40E+03	3,38	Negativo
ZTA13/00748	Congelado	2013	1,72E+00	3,40E+02	2,53	Negativo
ZTA13/01063	Congelado	2013	2,58E+02	5,11E+04	4,71	Positivo
ZTA13/01066	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01151	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01239	Congelado	2013	1,36E+02	2,69E+04	4,43	Positivo
ZTA13/01256	Congelado	2013	9,34E+01	1,85E+04	4,27	Negativo
ZTA13/01258	Congelado	2013	7,35E+02	1,45E+05	5,16	Positivo
ZTA13/01378	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01379	Congelado	2013	2,74E+01	5,42E+03	3,73	Negativo
ZTA13/01410	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01411	Congelado	2013	1,73E+02	3,42E+04	4,53	Positivo
ZTA13/01435	Congelado	2013	8,05E+01	1,59E+04	4,20	Negativo
ZTA13/01437	Congelado	2013	2,56E+03	5,07E+05	5,70	Positivo
ZTA13/01457	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01480	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01534	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01536	Congelado	2013	7,10E+01	1,41E+04	4,15	Negativo
ZTA13/01551	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01571	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01625	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/01720	Congelado	2013	1,55E+01	3,07E+03	3,49	Negativo
ZTA13/01973	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/02074	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/02086	Congelado	2013	3,31E+01	6,55E+03	3,82	Negativo
ZTA13/02111	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/02131	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/02132	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA13/02134	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/02150	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/02154	Congelado	2013	1,28E+02	2,53E+04	4,40	Positivo
ZTA13/02182	Congelado	2013	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA13/02279	Congelado	2013	2,25E+01	4,45E+03	3,65	Negativo
ZTA13/02318	Congelado	2013	8,55E+01	1,69E+04	4,23	Negativo
ZTA15/00192	Congelado	2015	5,62E+01	1,11E+04	4,05	Negativo
ZTA15/00218	Congelado	2015	1,64E+02	3,25E+04	4,51	Positivo
ZTA15/00235	Congelado	2015	8,41E+02	1,66E+05	5,22	Positivo
ZTA15/00332	Congelado	2015	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA15/00374	Congelado	2015	2,67E+01	5,29E+03	3,72	Negativo
ZTA15/00389	Congelado	2015	7,49E+01	1,48E+04	4,17	Negativo
ZTA15/00401	Congelado	2015	1,50E+04	2,97E+06	6,47	Positivo
ZTA15/00420	Congelado	2015	4,67E+03	9,24E+05	5,97	Positivo
ZTA15/00464	Congelado	2015	3,82E+01	7,56E+03	3,88	Negativo
ZTA15/00527	Congelado	2015	2,28E+03	4,51E+05	5,65	Positivo
ZTA15/00592	Congelado	2015	2,89E+03	5,72E+05	5,76	Positivo
ZTA15/00628	Congelado	2015	6,02E+02	1,19E+05	5,08	Positivo
ZTA15/00630	Congelado	2015	6,07E+02	1,20E+05	5,08	Positivo
ZTA15/00631	Congelado	2015	8,66E+03	1,71E+06	6,23	Positivo
ZTA15/00691	Congelado	2015	6,44E+02	1,27E+05	5,11	Positivo
ZTA15/00735	Congelado	2015	1,20E+02	2,38E+04	4,38	Positivo
ZTA15/00750	Congelado	2015	3,60E+02	7,13E+04	4,85	Positivo
ZTA15/00751	Congelado	2015	2,00E+02	3,96E+04	4,60	Positivo
ZTA15/00841	Congelado	2015	1,75E+03	3,46E+05	5,54	Positivo
ZTA15/00844	Congelado	2015	1,07E+04	2,12E+06	6,33	Positivo
ZTA15/00944	Congelado	2015	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA15/00983	Congelado	2015	1,84E+04	3,64E+06	6,56	Positivo
ZTA15/01180	Congelado	2015	9,25E+01	1,83E+04	4,26	Negativo
ZTA15/01196	Congelado	2015	3,11E+01	6,16E+03	3,79	Negativo
ZTA15/01313	Congelado	2015	8,47E+02	1,68E+05	5,22	Positivo
ZTA15/01360	Congelado	2015	2,27E+02	4,49E+04	4,65	Positivo
ZTA15/01362	Congelado	2015	6,02E+02	1,19E+05	5,08	Positivo
ZTA15/01384	Congelado	2015	3,52E+01	6,97E+03	3,84	Negativo
ZTA15/01518	Congelado	2015	6,19E+01	1,23E+04	4,09	Negativo
ZTA15/01556	Congelado	2015	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA15/01618	Congelado	2015	1,55E+02	3,07E+04	4,49	Positivo
ZTA15/01619	Congelado	2015	1,83E+04	3,62E+06	6,56	Positivo
ZTA15/01662	Congelado	2015	1,79E+04	3,54E+06	6,55	Positivo
ZTA15/01665	Congelado	2015	7,21E+02	1,43E+05	5,15	Positivo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA15/01679	Congelado	2015	6,84E+01	1,35E+04	4,13	Negativo
ZTA15/01704	Congelado	2015	5,02E+03	9,94E+05	6,00	Positivo
ZTA15/01705	Congelado	2015	6,13E+02	1,21E+05	5,08	Positivo
ZTA15/01825	Congelado	2015	3,97E+02	7,86E+04	4,90	Positivo
ZTA15/01847	Congelado	2015	3,10E+02	6,14E+04	4,79	Positivo
ZTA15/01918	Congelado	2015	1,03E+02	2,04E+04	4,31	Positivo
ZTA15/01919	Congelado	2015	7,69E+02	1,52E+05	5,18	Positivo
ZTA15/01962	Congelado	2015	8,05E+01	1,59E+04	4,20	Negativo
ZTA15/02079	Congelado	2015	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA15/02094	Congelado	2015	1,70E+02	3,37E+04	4,53	Positivo
ZTA15/02095	Congelado	2015	2,72E+03	5,38E+05	5,73	Positivo
ZTA15/02202	Congelado	2015	3,85E+04	7,62E+06	6,88	Positivo
ZTA15/02267	Congelado	2015	3,11E+01	6,16E+03	3,79	Negativo
ZTA15/02304	Congelado	2015	1,22E+03	2,42E+05	5,38	Positivo
ZTA15/02332	Congelado	2015	4,43E+01	8,77E+03	3,94	Negativo
ZTA15/02333	Congelado	2015	2,54E+01	5,03E+03	3,70	Negativo
ZTA17/00198	Congelado	2017	1,87E+03	3,70E+05	5,57	Positivo
ZTA17/00199	Congelado	2017	2,22E+01	4,39E+03	3,64	Negativo
ZTA17/00204	Congelado	2017	6,85E+02	1,36E+05	5,13	Positivo
ZTA17/00228	Congelado	2017	5,24E+02	1,04E+05	5,02	Positivo
ZTA17/00278	Congelado	2017	1,31E+02	2,59E+04	4,41	Positivo
ZTA17/00527	Congelado	2017	8,46E+01	1,67E+04	4,22	Negativo
ZTA17/00572	Congelado	2017	8,04E+01	1,59E+04	4,20	Negativo
ZTA17/00619	Congelado	2017	1,37E+02	2,71E+04	4,43	Positivo
ZTA17/00641	Congelado	2017	6,66E+03	1,32E+06	6,12	Positivo
ZTA17/00701	Congelado	2017	1,20E+03	2,38E+05	5,38	Positivo
ZTA17/00808	Congelado	2017	3,42E+02	6,77E+04	4,83	Positivo
ZTA17/00830	Congelado	2017	2,86E+03	5,66E+05	5,75	Positivo
ZTA17/00831	Congelado	2017	4,43E+02	8,77E+04	4,94	Positivo
ZTA17/01093	Congelado	2017	3,48E+02	6,89E+04	4,84	Positivo
ZTA17/01197	Congelado	2017	1,13E+02	2,24E+04	4,35	Positivo
ZTA17/01221	Congelado	2017	1,60E+02	3,17E+04	4,50	Positivo
ZTA17/01308	Congelado	2017	1,98E+01	3,92E+03	3,59	Negativo
ZTA17/01309	Congelado	2017	5,19E+01	1,03E+04	4,01	Negativo
ZTA17/01323	Congelado	2017	4,27E+01	8,45E+03	3,93	Negativo
ZTA17/01364	Congelado	2017	1,94E+02	3,84E+04	4,58	Positivo
ZTA17/01435	Congelado	2017	1,80E+01	3,56E+03	3,55	Negativo
ZTA17/01475	Congelado	2017	4,34E+02	8,59E+04	4,93	Positivo
ZTA17/01532	Congelado	2017	6,95E+01	1,38E+04	4,14	Negativo
ZTA17/01593	Congelado	2017	1,85E+02	3,66E+04	4,56	Positivo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA17/01604	Congelado	2017	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA17/01667	Congelado	2017	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA17/01677	Congelado	2017	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA17/01679	Congelado	2017	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA17/01698	Congelado	2017	2,73E+01	5,40E+03	3,73	Negativo
ZTA17/01709	Congelado	2017	5,70E+01	1,13E+04	4,05	Negativo
ZTA17/01810	Congelado	2017	4,29E+02	8,49E+04	4,93	Positivo
ZTA17/02054	Congelado	2017	2,62E+01	5,19E+03	3,71	Negativo
ZTA17/02225	Congelado	2017	2,70E+01	5,34E+03	3,73	Negativo
ZTA17/02299	Congelado	2017	4,90E+01	9,70E+03	3,99	Negativo
ZTA17/02325	Congelado	2017	1,48E+03	2,93E+05	5,47	Positivo
ZTA17/02388	Congelado	2017	2,75E+03	5,44E+05	5,74	Positivo
ZTA17/02449	Congelado	2017	1,81E+01	3,58E+03	3,55	Negativo
ZTA17/02672	Congelado	2017	1,00E+02	1,98E+04	4,30	Positivo
ZTA17/02684	Congelado	2017	3,11E+01	6,16E+03	3,79	Negativo
ZTA17/02723	Congelado	2017	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA17/02802	Congelado	2017	3,87E+03	7,66E+05	5,88	Positivo
ZTA17/02957	Congelado	2017	5,88E+02	1,16E+05	5,07	Positivo
ZTA17/03001	Congelado	2017	2,48E+03	4,91E+05	5,69	Positivo
ZTA17/03032	Congelado	2017	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA17/03056	Congelado	2017	5,41E+02	1,07E+05	5,03	Positivo
ZTA17/03092	Congelado	2017	7,87E+01	1,56E+04	4,19	Negativo
ZTA17/03107	Congelado	2017	6,69E+04	1,32E+07	7,12	Positivo
ZTA17/03108	Congelado	2017	1,92E+02	3,80E+04	4,58	Positivo
ZTA17/03152	Congelado	2017	2,69E+03	5,33E+05	5,73	Positivo
ZTA17/03171	Congelado	2017	3,30E+04	6,53E+06	6,82	Positivo
ZTA18/01728	Fresco	2018	1,48E+02	2,34E+03	3,37	Positivo
ZTA18/01733	Fresco	2018	1,13E+03	1,79E+04	4,25	Positivo
ZTA18/01740	Fresco	2018	1,26E+03	2,00E+04	4,30	Positivo
ZTA18/01748	Fresco	2018	6,01E+01	9,52E+02	2,98	Negativo
ZTA18/01749	Fresco	2018	1,10E+02	1,74E+03	3,24	Positivo
ZTA18/01750	Fresco	2018	3,51E+01	5,56E+02	2,75	Negativo
ZTA18/01820	Fresco	2018	6,67E+02	1,06E+04	4,02	Positivo
ZTA18/01824	Fresco	2018	1,16E+04	1,84E+05	5,26	Positivo
ZTA18/01831	Fresco	2018	3,99E+01	6,32E+02	2,80	Negativo
ZTA18/01834	Fresco	2018	2,97E+01	4,70E+02	2,67	Negativo
ZTA18/01835	Fresco	2018	1,20E+03	1,90E+04	4,28	Positivo
ZTA18/01873	Fresco	2018	3,19E+01	5,05E+02	2,70	Negativo
ZTA18/01893	Fresco	2018	2,84E+03	4,50E+04	4,65	Positivo
ZTA18/01940	Fresco	2018	6,86E+01	1,09E+03	3,04	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA18/01942	Fresco	2018	2,04E+01	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/01979	Fresco	2018	1,89E+01	2,99E+02	2,48	Negativo
ZTA18/01984	Fresco	2018	1,47E+02	2,33E+03	3,37	Positivo
ZTA18/02049	Fresco	2018	8,07E+01	1,28E+03	3,11	Negativo
ZTA18/02054	Fresco	2018	2,23E+02	3,53E+03	3,55	Positivo
ZTA18/02055	Fresco	2018	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/02086	Fresco	2018	2,92E+03	4,62E+04	4,67	Positivo
ZTA18/02091	Fresco	2018	3,68E+03	5,83E+04	4,77	Positivo
ZTA18/02093	Fresco	2018	5,76E+03	9,12E+04	4,96	Positivo
ZTA18/02161	Fresco	2018	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/02164	Fresco	2018	2,69E+02	4,26E+03	3,63	Positivo
ZTA18/02166	Fresco	2018	2,86E+01	4,53E+02	2,66	Negativo
ZTA18/02175	Fresco	2018	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/02188	Fresco	2018	2,11E+01	3,34E+02	2,53	Negativo
ZTA18/02226	Fresco	2018	8,75E+02	1,39E+04	4,14	Positivo
ZTA18/02228	Fresco	2018	1,57E+02	2,49E+03	3,40	Positivo
ZTA18/02319	Fresco	2018	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/02324	Fresco	2018	3,38E+01	5,35E+02	2,73	Negativo
ZTA18/02342	Fresco	2018	2,57E+02	4,07E+03	3,61	Positivo
ZTA18/02345	Fresco	2018	3,71E+02	5,88E+03	3,77	Positivo
ZTA18/02350	Fresco	2018	2,32E+01	3,67E+02	2,57	Negativo
ZTA18/02367	Fresco	2018	4,22E+01	6,68E+02	2,83	Negativo
ZTA18/02408	Fresco	2018	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/02412	Fresco	2018	7,92E+01	1,25E+03	3,10	Negativo
ZTA18/02413	Fresco	2018	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/02414	Fresco	2018	5,60E+01	8,87E+02	2,95	Negativo
ZTA18/02480	Fresco	2018	1,58E+01	2,50E+02	2,40	Negativo
ZTA18/02484	Fresco	2018	2,36E+01	3,74E+02	2,57	Negativo
ZTA18/02494	Fresco	2018	2,57E+01	4,07E+02	2,61	Negativo
ZTA18/02496	Fresco	2018	1,23E+03	1,95E+04	4,29	Positivo
ZTA18/02508	Fresco	2018	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA18/02511	Fresco	2018	1,60E+04	2,53E+05	5,40	Positivo
ZTA18/02512	Fresco	2018	1,18E+03	1,87E+04	4,27	Positivo
ZTA18/02518	Fresco	2018	3,85E+01	6,10E+02	2,79	Negativo
ZTA18/02566	Fresco	2018	3,44E+02	5,45E+03	3,74	Positivo
ZTA18/02576	Fresco	2018	4,61E+04	7,30E+05	5,86	Positivo
ZTA19/00430	Fresco	2019	8,46E+01	1,34E+03	3,13	Negativo
ZTA19/00472	Fresco	2019	2,70E+01	4,28E+02	2,63	Negativo
ZTA19/00506	Fresco	2019	3,16E+01	5,00E+02	2,70	Negativo
ZTA19/00560	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA19/00617	Fresco	2019	7,05E+02	1,12E+04	4,05	Positivo
ZTA19/00620	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/00634	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/00676	Fresco	2019	3,47E+01	5,50E+02	2,74	Negativo
ZTA19/00677	Fresco	2019	3,72E+01	5,89E+02	2,77	Negativo
ZTA19/00693	Fresco	2019	8,94E+01	1,42E+03	3,15	Negativo
ZTA19/00698	Fresco	2019	1,29E+03	2,04E+04	4,31	Positivo
ZTA19/00701	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/00741	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/00850	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/00898	Fresco	2019	1,02E+02	1,62E+03	3,21	Positivo
ZTA19/00904	Fresco	2019	1,44E+01	2,28E+02	2,36	Negativo
ZTA19/00951	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/00971	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01013	Fresco	2019	1,19E+02	1,88E+03	3,28	Positivo
ZTA19/01097	Fresco	2019	1,33E+01	2,11E+02	2,33	Negativo
ZTA19/01126	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01161	Fresco	2019	1,10E+02	1,74E+03	3,24	Positivo
ZTA19/01209	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01258	Fresco	2019	1,18E+01	1,87E+02	2,27	Negativo
ZTA19/01267	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01272	Fresco	2019	2,20E+01	3,48E+02	2,54	Negativo
ZTA19/01273	Fresco	2019	1,40E+03	2,22E+04	4,35	Positivo
ZTA19/01277	Fresco	2019	2,97E+02	4,70E+03	3,67	Positivo
ZTA19/01284	Fresco	2019	2,90E+01	4,59E+02	2,66	Negativo
ZTA19/01285	Fresco	2019	1,49E+02	2,36E+03	3,37	Positivo
ZTA19/01476	Fresco	2019	3,93E+01	6,22E+02	2,79	Negativo
ZTA19/01480	Fresco	2019	1,18E+02	1,87E+03	3,27	Positivo
ZTA19/01481	Fresco	2019	3,35E+03	5,31E+04	4,72	Positivo
ZTA19/01487	Fresco	2019	2,06E+01	3,26E+02	2,51	Negativo
ZTA19/01496	Fresco	2019	2,44E+02	3,86E+03	3,59	Positivo
ZTA19/01497	Fresco	2019	2,58E+01	4,09E+02	2,61	Negativo
ZTA19/01499	Fresco	2019	1,11E+02	1,76E+03	3,25	Positivo
ZTA19/01500	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01522	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01524	Fresco	2019	8,40E+01	1,33E+03	3,12	Negativo
ZTA19/01525	Fresco	2019	1,24E+02	1,96E+03	3,29	Positivo
ZTA19/01536	Fresco	2019	3,05E+01	4,83E+02	2,68	Negativo
ZTA19/01557	Fresco	2019	2,87E+01	4,55E+02	2,66	Negativo
ZTA19/01569	Fresco	2019	1,36E+01	2,15E+02	2,34	Negativo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación
ZTA19/01585	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01586	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01589	Fresco	2019	2,74E+02	4,34E+03	3,64	Positivo
ZTA19/01592	Fresco	2019	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA19/01593	Fresco	2019	6,54E+01	1,04E+03	3,02	Negativo
ZTA19/01608	Fresco	2019	3,35E+01	5,31E+02	2,73	Negativo
ZTA21/00116	Fresco	2021	4,71E+01	7,46E+02	2,87	Negativo
ZTA21/00118	Fresco	2021	8,86E+00	1,40E+02	2,15	Negativo
ZTA21/00124	Fresco	2021	2,08E+01	3,29E+02	2,52	Negativo
ZTA21/00126	Fresco	2021	2,13E+01	3,37E+02	2,53	Negativo
ZTA21/00141	Fresco	2021	2,22E+01	3,52E+02	2,55	Negativo
ZTA21/00142	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00144	Fresco	2021	2,25E+00	3,56E+01	1,56	Negativo
ZTA21/00150	Fresco	2021	2,17E+00	3,44E+01	1,55	Negativo
ZTA21/00151	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00173	Fresco	2021	1,07E+01	1,69E+02	2,23	Negativo
ZTA21/00174	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00184	Fresco	2021	4,75E+01	7,52E+02	2,88	Negativo
ZTA21/00185	Fresco	2021	4,27E+03	6,76E+04	4,83	Positivo
ZTA21/00186	Fresco	2021	3,39E+03	5,37E+04	4,73	Positivo
ZTA21/00209	Fresco	2021	2,19E+01	3,47E+02	2,54	Negativo
ZTA21/00212	Fresco	2021	1,62E+01	2,57E+02	2,41	Negativo
ZTA21/00223	Fresco	2021	1,40E+01	2,22E+02	2,35	Negativo
ZTA21/00241	Fresco	2021	1,79E+01	2,83E+02	2,45	Negativo
ZTA21/00242	Fresco	2021	1,14E+02	1,81E+03	3,26	Positivo
ZTA21/00250	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00251	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00254	Fresco	2021	2,94E+00	4,66E+01	1,68	Negativo
ZTA21/00256	Fresco	2021	1,46E+01	2,31E+02	2,37	Negativo
ZTA21/00258	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00259	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00260	Fresco	2021	5,49E+00	8,69E+01	1,94	Negativo
ZTA21/00261	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00262	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00264	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00265	Fresco	2021	3,12E+02	4,94E+03	3,69	Positivo
ZTA21/00267	Fresco	2021	2,70E+01	4,28E+02	2,63	Negativo
ZTA21/00272	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00292	Fresco	2021	1,92E+02	3,04E+03	3,48	Positivo
ZTA21/00293	Fresco	2021	2,36E+02	3,74E+03	3,57	Positivo

Referencia	Tipo de muestra	Año	fg ADN/µL	Copias/mg	Log_{10} copias/mg	Interpretación*
ZTA21/00309	Fresco	2021	2,14E+01	3,39E+02	2,53	Negativo
ZTA21/00311	Fresco	2021	2,94E+01	4,66E+02	2,67	Negativo
ZTA21/00313	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00315	Fresco	2021	3,75E+02	5,94E+03	3,77	Positivo
ZTA21/00327	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00337	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00339	Fresco	2021	1,73E+00	2,74E+01	1,45	Negativo
ZTA21/00342	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00343	Fresco	2021	8,76E+01	1,39E+03	3,14	Negativo
ZTA21/00344	Fresco	2021	3,14E+00	4,97E+01	1,71	Negativo
ZTA21/00345	Fresco	2021	6,49E+01	1,03E+03	3,01	Negativo
ZTA21/00346	Fresco	2021	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
ZTA21/00347	Fresco	2021	4,80E+03	7,60E+04	4,88	Positivo
ZTA21/00348	Fresco	2021	2,25E+02	3,56E+03	3,55	Positivo
ZTA21/00349	Fresco	2021	1,04E+01	1,65E+02	2,22	Negativo
ZTA21/00350	Fresco	2021	1,02E+01	1,62E+02	2,21	Negativo

*Interpretación llevada a cabo en realción a los resultados expresados en fg ADN/µL

Anexo V. Distribución de datos del estudio experimental de la capacidad de diseminación de aislados resistentes a colistina portadores de *mcr-1* en presencia y ausencia de colistina

Tabla VIII. Distribución de los datos de los animales por grupo de animales y día de muestreo.

Referencia	Grupo	Fecha muestra	Día de muestreo	Cantidad muestra (mg)
SAP19/00606	CTRL	01/06/2019	7	250
SAP19/00611	CTRL	03/06/2019	7	126
SAP19/00613	CTRL	03/06/2019	7	822
SAP19/00615	CTRL	03/06/2019	7	260
SAP19/00621	CTRL	30/05/2019	7	192
SAP19/00622	CTRL	03/06/2019	7	386
SAP19/00629	CTRL	03/06/2019	7	173
SAP19/00607	CTRL	02/06/2019	7	71*
SAP19/00608	CTRL	03/06/2019	7	2*
SAP19/00609	CTRL	03/06/2019	7	22*
SAP19/00610	CTRL	03/06/2019	7	16*
SAP19/00612	CTRL	03/06/2019	7	22*
SAP19/00614	CTRL	03/06/2019	7	82*
SAP19/00623	CTRL	03/06/2019	7	47*
SAP19/00624	CTRL	03/06/2019	7	26*
SAP19/00625	CTRL	03/06/2019	7	8*
SAP19/00626	CTRL	01/06/2019	7	38*
SAP19/00627	CTRL	03/06/2019	7	16*
SAP19/00628	CTRL	03/06/2019	7	12*
SAP19/00630	CTRL	03/06/2019	7	26*
SAP19/00631	1	05/06/2019	9	100
SAP19/00632	1	05/06/2019	9	400
SAP19/00633	1	05/06/2019	9	600
SAP19/00634	1	05/06/2019	9	600
SAP19/00635	1	05/06/2019	9	300
SAP19/00651	1	07/06/2019	11	200
SAP19/00652	1	07/06/2019	11	100
SAP19/00653	1	07/06/2019	11	100
SAP19/00654	1	07/06/2019	11	300
SAP19/00655	1	07/06/2019	11	200
SAP19/00686	1	10/06/2019	14	1200
SAP19/00687	1	10/06/2019	14	200
SAP19/00688	1	10/06/2019	14	900
SAP19/00689	1	10/06/2019	14	400
SAP19/00690	1	10/06/2019	14	300
SAP19/00726	1	17/06/2019	21	300
SAP19/00727	1	17/06/2019	21	1800
SAP19/00728	1	17/06/2019	21	900
SAP19/00729	1	17/06/2019	21	800

Referencia	Grupo	Fecha muestra	Día de muestreo	Cantidad muestra (mg)
SAP19/00730	1	17/06/2019	21	900
SAP19/00636	2	05/06/2019	9	600
SAP19/00637	2	05/06/2019	9	400
SAP19/00638	2	05/06/2019	9	500
SAP19/00639	2	05/06/2019	9	400
SAP19/00640	2	05/06/2019	9	700
SAP19/00656	2	07/06/2019	11	600
SAP19/00657	2	07/06/2019	11	500
SAP19/00658	2	07/06/2019	11	400
SAP19/00659	2	07/06/2019	11	700
SAP19/00660	2	07/06/2019	11	200
SAP19/00691	2	10/06/2019	14	900
SAP19/00692	2	10/06/2019	14	1300
SAP19/00693	2	10/06/2019	14	600
SAP19/00694	2	10/06/2019	14	600
SAP19/00695	2	10/06/2019	14	1500
SAP19/00731	2	17/06/2019	21	1200
SAP19/00732	2	17/06/2019	21	1100
SAP19/00733	2	17/06/2019	21	500
SAP19/00734	2	17/06/2019	21	2800
SAP19/00735	2	17/06/2019	21	2000
SAP19/00641	3	05/06/2019	9	400
SAP19/00642	3	05/06/2019	9	300
SAP19/00643	3	05/06/2019	9	400
SAP19/00644	3	05/06/2019	9	300
SAP19/00645	3	05/06/2019	9	600
SAP19/00661	3	07/06/2019	11	200
SAP19/00662	3	07/06/2019	11	300
SAP19/00663	3	07/06/2019	11	200
SAP19/00664	3	07/06/2019	11	600
SAP19/00665	3	07/06/2019	11	200
SAP19/00701	3	10/06/2019	14	700
SAP19/00702	3	10/06/2019	14	800
SAP19/00703	3	10/06/2019	14	500
SAP19/00704	3	10/06/2019	14	800
SAP19/00705	3	10/06/2019	14	800
SAP19/00741	3	17/06/2019	21	300
SAP19/00742	3	17/06/2019	21	500
SAP19/00743	3	17/06/2019	21	900

Referencia	Grupo	Fecha muestra	Día de muestreo	Cantidad muestra (mg)
SAP19/00744	3	17/06/2019	21	1700
SAP19/00745	3	17/06/2019	21	1200
SAP19/00646	4	05/06/2019	9	300
SAP19/00647	4	05/06/2019	9	300
SAP19/00648	4	05/06/2019	9	400
SAP19/00649	4	05/06/2019	9	300
SAP19/00650	4	05/06/2019	9	600
SAP19/00666	4	07/06/2019	11	400
SAP19/00667	4	07/06/2019	11	200
SAP19/00668	4	07/06/2019	11	200
SAP19/00669	4	07/06/2019	11	200
SAP19/00670	4	07/06/2019	11	300
SAP19/00706	4	10/06/2019	14	500
SAP19/00707	4	10/06/2019	14	900
SAP19/00708	4	10/06/2019	14	2000
SAP19/00709	4	10/06/2019	14	1000
SAP19/00710	4	10/06/2019	14	1000
SAP19/00746	4	17/06/2019	21	1400
SAP19/00747	4	17/06/2019	21	800
SAP19/00748	4	17/06/2019	21	1400
SAP19/00749	4	17/06/2019	21	200
SAP19/00750	4	17/06/2019	21	1600

* Animales excluidos del estudio ya que no se pudo obtener la cantidad mínima de muestra necesaria (al menos 100 mg) para llevar a cabo una correcta extracción de ADN

Tabla IX. Distribución de la cuantificación por qPCR a tiempo real del gen *mcr-1* en muestra directa de contenido cecal de pollos por grupo de animales y día de muestreo.

Referencia	Grupo	Día de muestreo	fg ADN/µL	Copias/mg	log copias/ mg	Interpretación
SAP19/00606	CTRL	7	2,72E+01	4,31E+02	2,63	Negativo
SAP19/00611	CTRL	7	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00613	CTRL	7	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00615	CTRL	7	2,49E+01	3,94E+02	2,60	Negativo
SAP19/00621	CTRL	7	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00622	CTRL	7	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00629	CTRL	7	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00631	1	9	1,27E+01	4,02E+02	2,60	Negativo
SAP19/00632	1	9	3,26E+01	5,16E+02	2,71	Negativo
SAP19/00633	1	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00634	1	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00635	1	9	3,85E+01	6,10E+02	2,79	Negativo
SAP19/00636	2	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00637	2	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00638	2	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00639	2	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00640	2	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00641	3	9	5,78E+04	9,15E+05	5,96	Positivo
SAP19/00642	3	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00643	3	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00644	3	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00645	3	9	5,16E+01	8,17E+02	2,91	Negativo
SAP19/00646	4	9	6,14E+01	9,72E+02	2,99	Negativo
SAP19/00647	4	9	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00648	4	9	6,60E+01	1,05E+03	3,02	Negativo
SAP19/00649	4	9	3,18E+03	5,04E+04	4,70	Positivo
SAP19/00650	4	9	2,02E+03	3,20E+04	4,51	Positivo
SAP19/00651	1	11	2,11E+01	3,34E+02	2,52	Negativo
SAP19/00652	1	11	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00653	1	11	5,10E+04	1,62E+06	6,21	Positivo
SAP19/00654	1	11	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00655	1	11	7,48E+01	1,18E+03	3,07	Negativo
SAP19/00656	2	11	4,28E+01	6,78E+02	2,83	Negativo
SAP19/00657	2	11	8,41E+05	1,33E+07	7,12	Positivo
SAP19/00658	2	11	2,30E+01	3,64E+02	2,56	Negativo
SAP19/00659	2	11	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00660	2	11	3,52E+01	5,57E+02	2,75	Negativo
SAP19/00661	3	11	8,97E+03	1,42E+05	5,15	Positivo

Referencia	Grupo	Día de muestreo	fg ADN/µL	Copias/mg	log copias/ mg	Interpretación
SAP19/00662	3	11	2,93E+02	4,64E+03	3,67	Positivo
SAP19/00663	3	11	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00664	3	11	3,40E+01	5,38E+02	2,73	Negativo
SAP19/00665	3	11	5,05E+01	8,00E+02	2,90	Negativo
SAP19/00666	4	11	1,07E+03	1,69E+04	4,23	Positivo
SAP19/00667	4	11	1,52E+04	2,41E+05	5,38	Positivo
SAP19/00668	4	11	4,71E+04	7,46E+05	5,87	Positivo
SAP19/00669	4	11	2,19E+04	3,47E+05	5,54	Positivo
SAP19/00670	4	11	5,70E+03	9,03E+04	4,96	Positivo
SAP19/00686	1	14	1,61E+01	2,55E+02	2,41	Negativo
SAP19/00687	1	14	4,28E+02	6,78E+03	3,83	Positivo
SAP19/00688	1	14	1,25E+01	1,98E+02	2,30	Negativo
SAP19/00689	1	14	1,67E+03	2,64E+04	4,42	Positivo
SAP19/00690	1	14	1,85E+01	2,93E+02	2,47	Negativo
SAP19/00691	2	14	1,21E+02	1,92E+03	3,28	Positivo
SAP19/00692	2	14	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00693	2	14	1,36E+03	2,15E+04	4,33	Positivo
SAP19/00694	2	14	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00695	2	14	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00701	3	14	1,09E+04	1,73E+05	5,24	Positivo
SAP19/00702	3	14	3,10E+04	4,91E+05	5,69	Positivo
SAP19/00703	3	14	1,82E+03	2,88E+04	4,46	Positivo
SAP19/00704	3	14	1,74E+04	2,76E+05	5,44	Positivo
SAP19/00705	3	14	4,14E+03	6,56E+04	4,82	Positivo
SAP19/00706	4	14	4,22E+05	6,68E+06	6,82	Positivo
SAP19/00707	4	14	1,91E+05	3,02E+06	6,48	Positivo
SAP19/00708	4	14	1,09E+04	1,73E+05	5,24	Positivo
SAP19/00709	4	14	6,45E+04	1,02E+06	6,01	Positivo
SAP19/00710	4	14	5,75E+04	9,11E+05	5,96	Positivo
SAP19/00726	1	21	5,51E+02	8,73E+03	3,94	Positivo
SAP19/00727	1	21	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00728	1	21	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00729	1	21	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00730	1	21	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00731	2	21	2,93E+01	4,64E+02	2,67	Negativo
SAP19/00732	2	21	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00733	2	21	9,70E+01	1,54E+03	3,19	Negativo
SAP19/00734	2	21	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00735	2	21	0,00E+00	0,00E+00	0,00	Negativo
SAP19/00741	3	21	3,88E+04	6,14E+05	5,79	Positivo
SAP19/00742	3	21	2,38E+04	3,77E+05	5,58	Positivo

Referencia	Grupo	Día de muestreo	fg ADN/µL	Copias/mg	log copias/ mg	Interpretación *
SAP19/00743	3	21	1,24E+04	1,96E+05	5,29	Positivo
SAP19/00744	3	21	1,02E+04	1,62E+05	5,21	Positivo
SAP19/00745	3	21	8,93E+03	1,41E+05	5,15	Positivo
SAP19/00746	4	21	2,02E+04	3,20E+05	5,51	Positivo
SAP19/00747	4	21	1,38E+04	2,19E+05	5,34	Positivo
SAP19/00748	4	21	1,03E+05	1,63E+06	6,21	Positivo
SAP19/00749	4	21	8,82E+03	1,40E+05	5,15	Positivo
SAP19/00750	4	21	6,79E+03	1,08E+05	5,03	Positivo

*Interpretación llevada a cabo en realción a los resultados expresados en fg ADN/µL

Tabla X. Distribución de la cuantificación por qPCR a tiempo real de *Salmonella* spp. en muestra directa de contenido cecal de pollos por grupo de animales y día de muestreo.

Referencia	Grupo	Día de muestreo	*Salmonella* spp. (fg ADN/µl)	*Salmonella* spp. (copias /mg contenido cecal)
SAP19/00641	3	9	1.32E+06	1.29E+07
SAP19/00642	3	9	0.00E+00	0.00E+00
SAP19/00643	3	9	3.93E+02	3.83E+03
SAP19/00644	3	9	5.32E+02	5.18E+03
SAP19/00645	3	9	1.12E+03	1.09E+04
SAP19/00661	3	11	1.14E+05	1.11E+06
SAP19/00662	3	11	3.84E+02	3.74E+03
SAP19/00663	3	11	0.00E+00	0.00E+00
SAP19/00664	3	11	3.34E+01	3.25E+02
SAP19/00665	3	11	1.55E+02	1.51E+03
SAP19/00701	3	14	2.86E+05	1.39E+04
SAP19/00702	3	14	4.07E+05	1.98E+04
SAP19/00703	3	14	2.01E+04	9.79E+02
SAP19/00704	3	14	2.83E+05	1.38E+04
SAP19/00705	3	14	6.38E+04	3.11E+03
SAP19/00741	3	21	9.36E+05	4.56E+04
SAP19/00742	3	21	5.86E+05	2.85E+04
SAP19/00743	3	21	1.22E+05	5.94E+03
SAP19/00744	3	21	1.39E+05	6.77E+03
SAP19/00745	3	21	2.31E+05	1.13E+04
SAP19/00646	4	9	0.00E+00	0.00E+00
SAP19/00647	4	9	0.00E+00	0.00E+00
SAP19/00648	4	9	1.69E+02	1.65E+03
SAP19/00649	4	9	5.35E+04	5.21E+05
SAP19/00650	4	9	9.72E+04	9.47E+05
SAP19/00666	4	11	1.34E+04	1.31E+05
SAP19/00667	4	11	1.76E+05	1.71E+06
SAP19/00668	4	11	5.35E+05	5.21E+06
SAP19/00669	4	11	2.93E+05	2.85E+06
SAP19/00670	4	11	4.60E+04	4.48E+05
SAP19/00706	4	14	7.27E+06	3.54E+05
SAP19/00707	4	14	3.39E+06	1.65E+05
SAP19/00708	4	14	1.67E+05	8.13E+03
SAP19/00709	4	14	9.64E+05	4.69E+04
SAP19/00710	4	14	7.04E+05	3.43E+04
SAP19/00746	4	21	5.51E+05	2.68E+04
SAP19/00747	4	21	3.81E+05	1.86E+04

Referencia	Grupo	Día de muestreo	*Salmonella* spp. (fg ADN/µl)	*Salmonella* spp. (copias /mg contenido cecal)
SAP19/00748	4	21	3.34E+05	1.63E+04
SAP19/00749	4	21	2.79E+05	1.36E+04
SAP19/00750	4	21	2.65E+05	1.29E+04

Tabla XI. Distribución de los resultados del recuento de *Salmonella* spp. en placa por grupo de animales y día de muestreo.

Referencia	Grupo	Día de muestreo	Recuento *Salmonella* spp. (UFC/mL)	Recuento *Salmonella* spp. (log10 UFC/mL)
SAP19/00606	CTRL	7	< 2,0	< 0.3
SAP19/00611	CTRL	7	< 2,0	< 0.3
SAP19/00613	CTRL	7	< 2,0	< 0.3
SAP19/00615	CTRL	7	< 2,0	< 0.3
SAP19/00621	CTRL	7	< 2,0	< 0.3
SAP19/00622	CTRL	7	< 2,0	< 0.3
SAP19/00629	CTRL	7	< 2,0	< 0.3
SAP19/00631	1	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00632	1	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00633	1	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00634	1	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00635	1	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00651	1	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00652	1	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00653	1	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00654	1	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00655	1	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00686	1	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00687	1	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00688	1	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00689	1	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00690	1	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00726	1	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00727	1	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00728	1	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00729	1	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00730	1	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00636	2	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00637	2	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00638	2	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00639	2	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00640	2	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00656	2	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00657	2	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00658	2	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00659	2	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00660	2	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00691	2	14	< 2,0	< 0.3

Referencia	Grupo	Día de muestreo	Recuento *Salmonella* spp. (UFC/mL)	Recuento *Salmonella* spp. (log10 UFC/mL)
SAP19/00692	2	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00693	2	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00694	2	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00695	2	14	< 2,0	< 0.3
SAP19/00731	2	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00732	2	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00733	2	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00734	2	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00735	2	21	< 2,0	< 0.3
SAP19/00641	3	9	4.92E+04	4.69
SAP19/00642	3	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00643	3	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00644	3	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00645	3	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00661	3	11	2.19E+04	4.34
SAP19/00662	3	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00663	3	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00664	3	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00665	3	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00701	3	14	1.20E+05	5.08
SAP19/00702	3	14	4.92E+04	4.69
SAP19/00703	3	14	3.28E+04	4.52
SAP19/00704	3	14	1.64E+04	4.21
SAP19/00705	3	14	1.64E+04	4.21
SAP19/00741	3	21	1.28E+05	5.11
SAP19/00742	3	21	1.26E+04	4.10
SAP19/00743	3	21	1.15E+04	4.06
SAP19/00744	3	21	3.50E+04	4.54
SAP19/00745	3	21	9.45E+04	4.98
SAP19/00646	4	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00647	4	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00648	4	9	< 2,0	< 0.3
SAP19/00649	4	9	2.73E+04	4.44
SAP19/00650	4	9	4.37E+04	4.64
SAP19/00666	4	11	< 2,0	< 0.3
SAP19/00667	4	11	1.09E+05	5.04
SAP19/00668	4	11	4.92E+04	4.69
SAP19/00669	4	11	1.09E+04	4.04
SAP19/00670	4	11	< 2,0	< 0.3

Referencia	Grupo	Día de muestreo	Recuento *Salmonella* spp. (UFC/mL)	Recuento *Salmonella* spp. (log10 UFC/mL)
SAP19/00706	4	14	2.73E+04	4.44
SAP19/00707	4	14	1.53E+05	5.18
SAP19/00708	4	14	1.09E+04	4.04
SAP19/00709	4	14	2.19E+05	5.34
SAP19/00710	4	14	3.66E+05	5.56
SAP19/00746	4	21	2.46E+04	4.39
SAP19/00747	4	21	1.54E+05	5.19
SAP19/00748	4	21	8.25E+04	4.92
SAP19/00749	4	21	1.91E+04	4.28
SAP19/00750	4	21	1.75E+04	4.24

Anexo VI. Trabajos publicados

I. Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

1. Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada N, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López-Orozco G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A: Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Eur Surveill.* 2017; 22(31):30586.

2. Miguela-Villoldo P, Hernandez M, Moreno MA, Rodriguez-Lazaro D, Quesada A, Domínguez L, Ugarte-Ruiz M: Carbapenemase-Producing *Elizabethkingia meningoseptica* from Healthy Pigs Associated with Colistin Use in Spain. *Antibiotics (Basel).* 2019;8(3).

3. Miguela-Villoldo P, Hernández M, Moreno MA, Rodríguez-Lázaro D, Quesada A, Domínguez L, Ugarte-Ruiz M: National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. *Res Vet Sci.* 2019;123:141-143.

4. Miguela-Villoldo P, Moreno MA, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Borge C, Quesada A, Domínguez L, Ugarte-Ruiz M: Complementarity of Selective Culture and qPCR for Colistin Resistance Screening in Fresh and Frozen Pig Cecum Samples. *Front Microbiol*. 2020;11(2793).

5. Miguela-Villoldo P, Moreno MA, Rebollada-Merino A, Rodríguez-Bertos A, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quesada A, Goyache J, Domínguez L, Ugarte-Ruiz M: Colistin Selection of the *mcr-1* Gene in Broiler Chicken Intestinal Microbiota. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(6):677.

6. Miguela-Villoldo P, Moreno MA, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Hernández M, Serrano T, Sáez JL, de Frutos C, Agüero M, Quesada A, Domínguez L, Ugarte-Ruiz M: Longitudinal study of the *mcr-1* gene prevalence in Spanish food-producing pigs from 1998 to 2021 and its relationship with the use of polymyxins. *Porc Health Manag*. 2022;8(1):12.

RAPID COMMUNICATIONS

Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015

M Hernández [1,2,3], MR Iglesias [3,4], D Rodríguez-Lázaro [3,5], A Gallardo [4], NM Quijada [1], P Miguela-Villoldo [6], MJ Campos [7], S Píriz [8], G López-Orozco [9], C de Frutos [10], JL Sáez [9], M Ugarte-Ruiz [6], L Domínguez [6,11], A Quesada [4,12]

1. Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain
2. Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Tecnología de los Alimentos, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, Palencia, Spain
3. These authors contributed equally to the manuscript
4. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain
5. Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Burgos, Burgos, Spain
6. VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain
7. MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, Instituto Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal
8. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain
9. Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, Spain
10. Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Algete, Spain
11. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain.
12. INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

Correspondence: María Ugarte-Ruiz (maria.ugarte@visavet.ucm.es)

Citation style for this article:
Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada NM, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López-Orozco G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A. Co-occurrence of colistin-resistance genes mcr-1 and mcr-3 among multidrug-resistant Escherichia coli isolated from cattle, Spain, September 2015. Euro Surveill. 2017;22(31):pii=30586. DOI: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30586

Article submitted on 20 July 2017 / accepted on 02 August 2017 / published on 03 August 2017

Colistin resistance genes *mcr-3* and *mcr-1* have been detected in an *Escherichia coli* isolate from cattle faeces in a Spanish slaughterhouse in 2015. The sequences of both genes hybridised to same plasmid band of ca 250 kb, although colistin resistance was non-mobilisable. The isolate was producing extended-spectrum beta-lactamases and belonged to serotype O9:H10 and sequence type ST533. Here we report an *mcr-3* gene detected in Europe following earlier reports from Asia and the United States.

Very recently, in June 2017, Yin et al. detected a third mobile colistin resistance gene *mcr-3* on an IncHI2-type plasmid, pWJ1, in a porcine *E. coli* isolate from Malaysia [1]. The authors also identified similar elements in a shotgun genome sequence of a human *Klebsiella pneumoniae* isolate from Thailand and a human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate from the United States [1].

We found an *Escherichia coli* isolate carrying the *mcr-3* gene among other isolates expressing colistin resistance. It was sampled in cattle faeces at the time of slaughter in Spain in September 2015. The aim of this paper is to describe the presence of *mcr*-3 in Europe in a strain also carrying the *mcr*-1 gene.

Screening of bovine samples for colistin-resistant bacteria

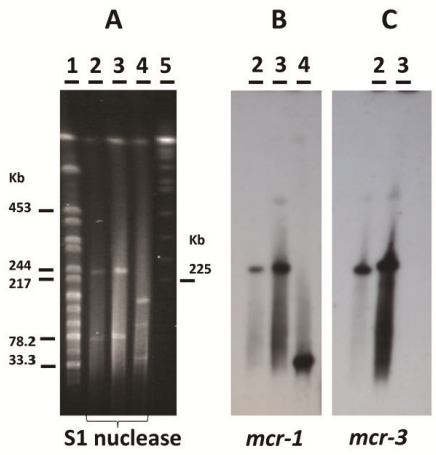
The VISAVET Health Surveillance Centre in Madrid has been carrying out the national surveillance for detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria in food-producing animals since 2014, commissioned by the Spanish Ministry of Agriculture and Fishing, Food and Environment according to Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2]. The screening was performed at slaughterhouses during 2015 on healthy cattle younger than one year from 318 farms (caecal content of 636 animals). The procedure followed the EURL-AR recommendations for detecting ESBL-producing *E. coli* [3].

A total of 152 samples (47.8%) were suspected to be positive, so antimicrobial susceptibility testing was performed by Sensititre microbroth dilution using EUVSEC and EUVSEC2 plates (Trek Diagnostic Systems, US) to confirm their beta-lactamase production. The antimicrobial drugs to be included in each panel are detailed in the Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2]. Six *E. coli* isolates were found resistant to colistin and further characterised. Among them, five were PCR-positive for *mcr*-1 [4] and one isolate (ZTA15/01169–1EB1) was also PCR-positive for *mcr*-3 [1]. All isolates presented multi-resistant phenotypes (Table 1) and lacked the *mcr*-2 gene [5].

Check for updates

Figure

S1 nuclease mapping of *mcr-1* and *mcr-3.2* genes in *Escherichia coli* ZTA15/01169–1EB1, Spain, September 2015



A. PFGE was performed in a Bio-Rad CHEF-DRII electrophoresis system, and agarose plugs were prepared according to manufacturer instructions. *XbaI* and S1 nuclease treatments were performed as previously described [17]. Lane 1: *XbaI*-digested *Salmonella* Braenderup; Lanes 2 and 3: S1 nuclease-digested *E. coli* ZTA15/01169 at 1× (108 cells/mL plug) and 3× concentration, respectively; Lane 4: S1 nuclease-digested *E. coli* HSP38 (carrying *mcr-1* by IncX4 plasmid) [15]; Lane 5: *Saccharomyces* cerevisiae chromosomes as a second molecular weight marker (Bio-Rad, US).

B. Southern hybridisation to Dig-labelled probes (Sigma, US) from *mcr-1* sequences.

C. Southern hybridisation to Dig-labelled probes (Sigma, US) from *mcr-3* sequences.

Both *mcr-1* and *mcr-3* genes were detected by PCR using previously described primers and conditions [1,4]. Minimal inhibitory concentrations were determined by using the two-fold broth microdilution reference method according to ISO 20776–1:2006 [6]. The interpretation of the quantitative data was performed as described by the Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2], EURL-AR (the EU Reference Laboratory for antimicrobial resistance in the context of animal health and food safety) and The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [7].

The isolate ZTA15/01169–1EB1 carrying both *mcr-1* and *mcr-3* was resistant to most antimicrobial drugs analysed, including ampicillin, azithromycin, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, gentamicin, nalidixic acid, sulfamethoxazole, tetracycline and trimethoprim. The isolate was sensitive to carbapenems, cefoxitin, temocillin and tigecyclin (Table 1).

Characterisation of the *mcr-1* and *mcr-3 Escherichia coli* isolate

DNA from isolate ZTA15/01169–1EB1 was extracted with the QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit and sequencing libraries were prepared using the Nextera XT kit and sequenced on a MiSeq (Illumina) using v3 reagents with 2 x 300 cycles. This isolate produced 547,226 reads that were assembled using SPAdes v 3.9.0 [8]. The draft genome of 5,115,727 bp was composed by 495 contigs (N50 = 23,843, 29X coverage) and genome annotation was performed by using Prokka [9]. The profiles of serotype O9:H10, ST533, rST 30316, cgST 47043 and wgST 49795 were predicted by using EnteroBase (http://enterobase.warwick.ac.uk). The resistome of the draft genome was analysed by blastn [10] searches against the ResFinder database [11]. The presence of putative plasmids was evaluated by blastn searches against the PlasmidFinder database, revealing 100% identity to sequence probes from IncHI2 and IncI1 replicons (Table 2) [12]. Both colistin resistance genes carried by isolate ZTA15/01169–1EB1, *mcr-1* and *mcr-3*, are plasmidic and have been associated with HincHI2 plasmids [1,13].

mcr-1 was found in a 2,074 bp-length contig, and blastn comparison against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database [14] revealed best match with the IncHI2-type plasmid pECJS-59–244 previously described [13]. *mcr-3* was found in a 4,098 bp-length contig, and blastn of the gene showed 100% coverage (1–1626/1626) and 99,94% nucleotide identity to *mcr*-3. A unique polymorphism (C1463T) was found in its coding sequence, giving rise to a T488I variant of the protein encoded by this gene allele, hereafter named *mcr*-3.2. Moreover, isolate ZTA15/01169–1EB1 contained the mutations S83L and D87N of *Gyr*A, in complete concordance with the phenotypic results (Table 1), in addition to two beta-lactamase-encoding genes (blaCTX-M-55 and blaTEM-1) and several other resistance determinants (Table 2). CTX-M is a widely spread ESBL that could be encoded by IncHI2 and HincI1, among other plasmids [13].

Plasmid location of the *mcr-1* and *mcr*-3.2 genes from isolate ZTA15/01169–1EB1 was evidenced by nuclease S1 digestion and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), followed by transfer of DNA to nylon membranes and hybridisation to Dig-labelled probes (Sigma, US). Specific signals obtained by using probes for both *mcr-1* and *mcr-3*, matched a plasmid band of ca 250 kb (Figure). Specificity of the *mcr*-1 probe was evidenced by using a previously characterised strain carrying *mcr-1* on a 30 kb IncX4 plasmid [15]. A second ca75 kb plasmid was identified by PFGE in isolate ZTA15/01169–1EB1 (Figure). However, despite the plasmidic location of the *mcr-1* and *mcr*-3.2 genes, colistin resistance was not mobilisable by conjugation in standard conditions (overnight mating at 37 °C) to the receptor strain *E. coli*

Check for updates

Table 1

Colistin resistance genes and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates of bovine origin, Spain, September 2015 (n = 6)

	ZTA15/ 01169–1EB1	ZTA15/ 00213–1EB1	ZTA15/ 00579–1EB1	ZTA15/ 01425–1EB1	ZTA15/ 01928–1EB1	ZTA15/ 02163–1EB1
Presence of *mcr* gene						
mcr-1	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
mcr-3	Yes	No	No	No	No	No
Antimicrobial resistance (minimal inhibitory concentrations)						
COL	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)	4 (R)
CIP	>8 (R)	8 (R)	>8 (R)	>8 (R)	8 (R)	8 (R)
NAL	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)
AMP	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)
FEP	>32 (R)	4 (R)	>32 (R)	16 (R)	>32 (R)	16 (R)
FOT	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)	>4 (R)
FOT2	>64 (R)	16 (R)	>64 (R)	64 (R)	>64 (R)	>64 (R)
FOX	4	16 (R)	8	8	4	4
TAZ	>8 (R)	>8 (R)	8 (R)	4 (R)	8 (R)	8 (R)
TAZ2	8 (R)	128 (R)	16 (R)	4 (R)	8 (R)	8 (R)
TRM	16	16	8	8	8	≤4
ETP	0.03	≤0.015	0.03	0.03	0.06	0.03
IMI	≤0.12	≤0.12	≤0.12	0.25	0.25	0.25
MER	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03
MER2	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03	≤0.03
AZI	64 (R)	64 (R)	8	4	≤2	≤2
CHL	>128 (R)	128 (R)	128 (R)	32 (R)	8	128 (R)
GEN	>32 (R)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
TET	>64 (R)	64 (R)	32 (R)	>64 (R)	64 (R)	>64 (R)
SMX	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)	>1,024 (R)
TMP	>32 (R)	0.5	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)
TGC	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25

AMP: ampicillin; AZI: azithromycin; CHL: chloramphenicol; CIP: ciprofloxacin; COL: Colistin; ETP: ertapenem; FEP: Cefepime; FOT/FOT2: cefotaxime; FOX: cefoxitin; GEN: gentamicin; IMI: imipenem; MER/MER2: meropenem; NAL: nalidixic acid; SMX: sulfamethoxazole; TAZ/TAZ2: ceftazidime; TET: tetracycline; TGC: tigecyclin; TMP: trimethoprim; TRM: temocillin.

Antibiotics are ordered according to importance/clinical impact in food-producing animals.

Resistance is indicated by (R).

mcr-1 and mcr-3 genes were detected by PCR using previously described primers and conditions [1,4]. Minimal inhibitory concentrations were determined by using the two-fold broth microdilution reference method according to ISO 20776–1:2006 [6]. The interpretation of the quantitative data was performed as described by the Commission Implementing Decision 2013/652/EU [2], EURL-AR (EU Reference Laboratory for antimicrobial resistance in the context of animal health and food safety) and EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [7].

J53 after selection in medium with sodium azide (100 mg/L) and colistin (2 mg/L). The previously described *E. coli* isolate ZTA14/01057 was used as a positive control in parallel, and conjugation to the same recipient was successful with 4.2·10−2 efficiency [16].

Discussion and conclusions

The first plasmid-mediated polymyxin resistance mechanism, *mcr-1*, was reported in 2016 by Liu et al. in human *E. coli* and *K. pneumoniae* collected from five provinces in China between April 2011, and November 2014 [4]. A second resistance gene, *mcr-2*, was identified in porcine and bovine *E. coli* in Belgium in June 2016 [5], and as recently as in June 2017, Yin et al. reported the finding of the third gene, *mcr-3*, in a porcine *E. coli* isolate from Malaysia and two humans isolates of *K. pneumoniae* and *S. enterica* serovar Typhimurium from Thailand and the United States, respectively [1]. We also demonstrated in 2016 the presence of *mcr-1* in *E. coli* and *S. enterica* isolates from poultry and swine in Spain [15]. In addition to these findings, this work describes the results of screening for multidrug-resistant *E. coli* (including polymyxin resistance) of bovine origin in Spain. Among the colistin-resistant isolates found, three genotypes were identified: strains carrying *mcr*-1 alone, strains carrying *mcr*-1 and *mcr*-3.2, and strains without any plasmidic determinants. This study shows the appearance of the colistin-resistant *mcr*-3 gene in Europe as early as in 2015, as well as the coexistence of two plasmid-mediated colistin resistance genes, *mcr*-1 and *mcr*-3.2 in the same cells of isolate ZTA15/01169–1EB1.

Check for updates

Table 2

Resistome and plasmid profiles of *Escherichia coli* ZTA15/01169–1EB1, Spain, September 2015

Sequences	Coverage[a]	Identity (%)	AN[b]
aac(3)-IId	1–861/861	99.884	EU022314
aadA1	1–972/972	97.428	X02340
aadA2	1–792/792	99.747	JQ364967
blaCTX-M-55	1–876/876	100	GQ456159
blaTEM-1A	1–854/861	100	HM749966
dfrA1	1–474/474	100	JQ690541
floR	1–1214/1215	98.188	AF118107
mcr-1	1–1626/1626	100	KP347127
mcr-3	1–1626/1626	99.94	KY924928
mph(A)_1	1–906/906	100	D16251
mph(A)_2	1–921/921	99.675	U36578
strA	1–804/804	100	M96392
strB	1–837/837	100	M96392
sul1	1–927/927	100	CP002151
sul3	1–792/792	100	AJ459418
tet(A)	1–1200/1200	100	AJ517790
IncHI2 (*repHI2*)	1–327/327	100	BX664015
IncI1_1_Alpha (RNAI-I1)	1–142/142	100	AP005147

Resistance and plasmid determinants were identified against the ResFinder and PlasmidFinder databases, respectively [9,12].

[a] Number of query nucleotides found in the obtained draft genome compared to the total length of each reference gene sequence deposited in the ResFinder and/or PlasmidFinder databases.

[b] GenBank accession number.

Whole genome sequencing of isolate ZTA15/01169–1EB1 revealed *mcr-1* upstream a complete PAP2 gene in a 2,074 bp contig that showed 99.96% coverage and 100% identity to the IncHI2-type plasmid pECJS-59–244 (243,572 bp; 10). The *mcr*-3.2 gene was positioned in a 4,098 bp contig, sharing 100% coverage and 99.94% identity with the *mcr-3* gene located in the IncHI2-type plasmid pWJ1 (261,119 nt) previously described [1].

Most *mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3* genes are plasmidic sequences [1,4,5]. Although the PFGE and further hybridisation with *mcr-1*- and *mcr-3*-specific probes did not exclude the possibility of independent carriage by two different similar-sized plasmids, genome sequencing of isolate ZTA15/01169–1EB1 only identified the IncHI2 replicon as an appropriate candidate to harbour colistin resistance genes. We therefore assume that both genes were located on the same plasmid in our isolate.

Further efforts are focused on investigating the structure of plasmids, transmission potential, gene expression and stability of the *mcr-1* and *mcr*-3.2 genes. Furthermore, the reason why co-occurrence of *mcr*-1 and *mcr*-3 genes confers low colistin resistance needs to be elucidated.

Acknowledgements

This study was supported by The Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (AGL2016-74882-C3), the Spanish Ministry of Agriculture and Fishing, Food and Environment, the Autonomous Community of Madrid (S2013/ABI-2747), The Junta de Extremadura (Spain) and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional; GR15075 and IB16073) and UID/MAR/04292/2013 (FCT, Portugal). M.R.I. and N.M.Q received PhD fellowships, respectively, from the "Fundación Tatiana de Guzmán El Bueno" (Spain) and the Spanish National Institute for Agriculture and Food Research and Technology (INIA) (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad; fellowship FPI2014-020).

This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession NMWW00000000. The version described in this paper is version NMWW01000000.

The authors wish to thank María García, Estefanía Rivero and Nisrin Massoumi for their technical assistance at the Foodborne Zoonoses and Antibiotic Resistance Unit.

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

Strategy design: MH, DRL, SP, MUR, LD, AQ

Experiments performance: MH, MRI, DRL, MUR, AQ

Bioinformatic analysis: MH, DRL, AQ

Manuscript writing and discussion: MH, DRL, AG, NMQ, PMV, MJC, GLO, CF, JLS, MUR, LD, AQ

References

1. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in Escherichia coli. MBio. 2017;8(3):e00543-17. DOI: 10.1128/mBio.00543-17 PMID: 28655818
2. European Commission. Commission implementing decision 2013/652/EU on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. Official Journal of the European Union. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 14.11.2013:L 303. Available from: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2013:303:FULL&from=EN
3. Hasman H, Agersø Y, Hendriksen R, Cavaco LM, Guerra-Roman B. Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing E. coli from caecal samples. Laboratory Protocol. Version 4. Lyngby: DTU Food; Jan 2017. Available from: http://www.eurl-ar.eu/data/images/protocols/esbl_ampc_cpeprotocol_version_caecal_january2017_version4.pdf
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7 PMID: 26603172
5. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016;21(27):30280. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280 PMID: 27416987
6. International Organization for Standardization (ISO). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1:2006.

Check for updates

Geneva: ISO; 2006. Available from: https://www.iso.org/standard/41630.html

7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Växjö: EUCAST. [Accessed: July 2017]. Available from:http://https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init
8. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021 PMID: 22506599
9. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30(14):2068-9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153 PMID: 24642063
10. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences.J Comput Biol. 2000;7(1-2):203-14. DOI: 10.1089/10665270050081478 PMID: 10890397
11. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012;67(11):2640-4. DOI: 10.1093/jac/dks261 PMID: 22782487
12. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):3895-903. DOI: 10.1128/AAC.02412-14 PMID: 24777092
13. Li R, Xie M, Zhang J, Yang Z, Liu L, Liu X, et al. Genetic characterization of mcr-1-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. J Antimicrob Chemother. 2017;72(2):393-401. DOI: 10.1093/jac/dkw411 PMID: 28073961
14. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information.Nucleic Acids Res. 2017;45(D1):D12-7. DOI: 10.1093/nar/gkw1071 PMID: 27899561
15. Sánchez-Benito R, Iglesias MR, Quijada NM, Campos MJ, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, et al. Escherichia coli ST167 carrying plasmid mobilisable mcr-1 and blaCTX-M-15 resistance determinants isolated from a human respiratory infection. Int J Antimicrob Agents. 2017;S0924-8579(17)30181-4. (Forthcoming).PMID: 28599866
16. Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from poultry and swine in Spain. Res Vet Sci. 2016;105:134-5. DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.02.003 PMID: 27033921
17. Nonaka L, Maruyama F, Onishi Y, Kobayashi T, Ogura Y, Hayashi T, et al. Various pAQU plasmids possibly contribute to disseminate tetracycline resistance gene tet(M) among marine bacterial community. Front Microbiol. 2014;5(5):152. PMID: 24860553

License and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence, and indicate if changes were made.

This article is copyright of the authors, 2017.

Check for updates

Research in Veterinary Science 123 (2019) 141–143

Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

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

National colistin sales *versus* colistin resistance in Spanish pig production

Pedro Miguela-Villoldo[a,b], Marta Hernández[c,d], Miguel A. Moreno[a,b,*], David Rodríguez-Lázaro[e], Alberto Quesada[f,g], Lucas Domínguez[a,b], María Ugarte-Ruiz[a]

[a] VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain
[b] Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain
[c] Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain
[d] Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Tecnología de los Alimentos, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, Palencia, Spain
[e] Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Burgos, Burgos, Spain
[f] Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain
[g] INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

Colistin resistance was associated with infrequent spontaneous mutations that reduce bacterial fitness until 2015, when the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr*-1 was discovered in China (Liu et al., 2016). The *mcr*-1 gene was reported for the first time in Southern Europe in 2016 in nine strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from farm animals (poultry and pigs) (Quesada et al., 2016). Currently, eight different *mcr* genes have been reported (*mcr*-1 to 8) (Garcia et al., 2018) (Yang et al., 2018) (Wang et al., 2018). Nevertheless, only *mcr*-1, 3, and 4 have been found in Spain (Hernandez et al., 2017) (Quesada et al., 2016) (Carattoli et al., 2017).

Food-producing animals, particularly pigs, have been shown to be potential reservoirs for the dissemination of colistin resistance (Garcia et al., 2018). Antimicrobial chemotherapy, particularly colistin, has been the treatment of first choice to control Gram-negative bacteria in pig production, habitually used as a prophylactic approach (Moreno, 2014). Paradoxically, colistin is now considered to be a last resort antibiotic in human clinical practice. In 2013, the European Medicines Agency (EMA) recommended to practice responsible use of colistin, limiting its use to the treatment of animal diseases and avoiding its use for metaphylaxis (European Medicines Agency, 2013). Similarly, in July 2016, the EMA called to minimize the use of colistin in animals in the European Union (EU), aiming for a target at country level of 5 mg/population correction unit (PCU) and a desirable level of 1 mg/PCU (European Medicines Agency, 2013). Consequently, in September 2016, the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (AEMPS) established a voluntary strategic plan "*Programa Reduce Colistina*" to reduce colistin use in pigs within the Spanish Plan against antibiotic resistance (PRAN) (Plan Nacional Resistencia Antibióticos (PRAN), 2018). A total of 70% of Spanish pig production companies joined the program, representing 80% of Spanish pig production (AEMPS, 2018). We aimed to early assess the impact of these recommendations and how the drop in antibiotic use has influenced colistin resistance levels in pigs in Spain.

1. Fecal samples and isolation of colistin resistant Gram-negative bacteria

Pig feces collected in the frame of samplings carried out in Spain for surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin were used. They were randomly taken from the pig samplings covering all the country and performed according to the rules of the EU Authorities (European Commission, 2013). Samples were diluted in buffered peptone water and stored under glycerol at -40 °C. Forty fecal samples per year were randomly selected from those collected in 2012, 2013, 2015 and 2017 and stored in the VISAVET biocollection. They were streaked onto the chromogenic selective medium CHROMOID® Colistin R Agar (bioMérieux), according to the manufacturer's instructions. Samples were considered to be positive when at least one colistin-resistant isolate grew and its resistance was confirmed by an antimicrobial susceptibility test.

2. Phenotypic characterization of the colistin-resistant isolates

One colony of each morphology detected from each plate was subcultured in blood agar at 37 °C for 24 h. Isolates were identified by mass spectrometry using a Bruker Daltonics UltrafleXtrem MALDI TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Further identification was performed for poorly identified isolates (score < 2.3) using the API® 20-E *Enterobacteriaceae* identification kit (bioMerieux) and specific PCR (Cabal et al., 2013). Phenotypic characterization of the isolates was performed by the antimicrobial susceptibility test. Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined using the two-fold broth microdilution reference method, according to ISO 20776-1:2006 (International Organization for Standardization (ISO), 2006). Interpretation of quantitative data was performed as described by Commission Implementing Decision 2013/652/EU (European Commission, 2013) and The European Committee on Antimicrobial

* Corresponding author at: VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain.
E-mail address: mamoreno@ucm.es (M.A. Moreno).

https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.010
Received 22 November 2018; Received in revised form 17 December 2018; Accepted 8 January 2019
0034-5288/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Detection and characterization of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* in pig fecal samples from 2012 to 2017 in Spain.

Year	Positive fecal samples	Bacterial species	Number of isolates	*mcr* genes (colistin MIC μg/mg)***		
				mcr-1	*mcr-4*	No *mcr*
2012	12/40*	*Escherichia coli*	12	3 (4), 7 (8)	–	2 (≤2)
	(30/25)**	*Citrobacter freundii*	1	–	1 (8)	–
		Klebsiella pneumoniae	2	–	–	1 (≤2), 1(4)
		Elisabethkingia spp.	1	–	–	1 (> 16)
		Total	**16**	**10**	**1**	**5**
2013	9/40*	*Escherichia coli*	8	2 (4), 5 (8)	–	1 (≤2)
	(23/20)**	*Citrobacter freundii*	1	–	1 (16)	–
		Total	**9**	**7**	**1**	**1**
2015	24/40*	*Escherichia coli*	31	7 (4), 22 (8)	1 (4)	1 (8)
	(60/60)**	*Escherichia fergusonii*	3	1 (4), 2 (8)	–	–
		Klebsiella pneumoniae	2	1 (16)	–	1 (> 16)
		Klebsiella oxytoca	2	–	–	1(8), 1 (16)
		Total	**38**	**33**	**1**	**4**
2017	14/40*	*Escherichia coli*	9	2 (4), 7 (8)	–	–
	(35/35)**	*Escherichia fergusonii*	2	2 (8)	–	–
		Salmonella enterica	1	1 (8)	–	–
		Kluyvera spp.	1	1 (4)	–	–
		Total	**13**	**13**	**–**	**–**
		Total	76	63	3	10
		% Total	**100%**	**83%**	**4%**	**13%**

* Number of samples with bacterial growth in COLR medium/number of tested samples.
** Percentage of samples with bacterial growth in COLR medium (CHROMOID® Colistin R Agar, bioMérieux)/percentage of samples with at least one colistin resistant isolate confirmed by an antimicrobial susceptibility test.
*** Number of isolates with or without *mcr* genes. In brackets, colistin minimal inhibitory concentrations (MIC; μg/mg) of each isolate.

Susceptibility Testing EUCAST (2018). Colistin resistance was confirmed in 72/76 isolates (95%). Different colistin-resistant bacterial species were identified, showing a variety of MICs for colistin, of which *E. coli* was the most frequent colistin-resistant species found (Table 1). All colistin-resistant strains were multiresistant. The most frequent resistance pattern was sulfamethoxazole-trimethoprim-tetracycline-ampicilin-colistin, which was present in 53/76 isolates. A extended-spectrum β-lactamases (ESBL) phenotypic profile was detected in three *E. coli* isolates (EFSA and ECDC, 2018).

We observed variations in the percentage of colistin-resistant samples (Table 1). Proportion of colistin-resistant isolates obtained decreased slightly in 2013 (from 25% in 2012 to 20% in 2013), increased in 2015 (60%) and then dropped again in 2017 (Fig. 1).

3. Molecular detection of *mcr* genes and *mcr*-1 quantification

We tested for the presence of *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3, and *mcr*-4 genes in all 76 isolates which have grown in cultures by PCR (although four of them were not colistin- resistant by antimicrobial susceptibility test) (Rebelo et al., 2018). Eighty-three percent of the isolates tested positive for the *mcr*-1 gene and only three were found to be positive for the *mcr*-4 gene (two isolates identified as *Citrobacter freundii* and one as *E. coli*). Co-occurrence of *mcr*-1 and *mcr*-4 genes has not shown in this study. Thirteen percent of the isolates were negative for the *mcr* genes tested. Further analysis would be required to confirm their resistance mechanism (Table 1).

The *mcr*-1 gene is the most frequently associated with colistin-resistant *Enterobacteriaceae*, and is prevalent in animals worldwide (Sun et al., 2017). We thus included this gene in our study as another indicator to estimate colistin resistance in Spanish pig samples. Direct DNA extraction from pig feces samples was coupled with a *mcr*-1 specific real-time PCR assay for quantitative detection of the *mcr*-1 gene (Li et al., 2017). In this assay, samples were considered positive to *mcr*-1 when the values obtained were equal or higher than quantitation limit ($6{,}33 \times 10^3$ copies/PCR reaction). The *mcr*-1 gene was detected for all years. The frequency of *mcr*-1-positive samples showed a similar trend

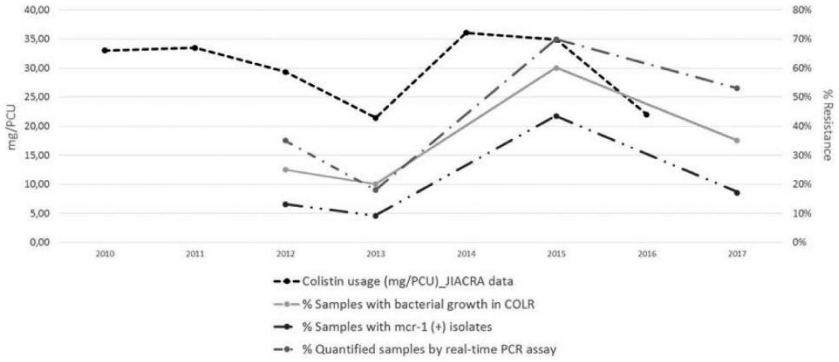


Fig. 1. Veterinary colistin use in Spain *vs* the percentage of fecal samples containing colistin-resistant bacteria (direct isolation or positive for *mcr-1* by real-time PCR) and *mcr-1* positive isolates observed in this study.

to that using traditional cultures: 35% in 2012, 18% in 2013, 70% in 2015, and 53% in 2017 (Fig. 1).

4. Colistin use *vs* colistin resistance

Our results on colistin resistance followed a similar trend to that on figures of total veterinary sales of colistin in Spain published by the AEMPS (AEMPS, 2018) (Fig. 1), showing a good correlation (rho Spearman coefficient = 1, IBM SPSS 22) between sales and resistance, including the spread of *mcr*-1, the main colistin-resistance determinant in Enterobacteriaceae (Poirel et al., 2017). It has been previously suggested that colistin-resistance may be linked to the inappropriate use of this antibiotic in animal production (Sun et al., 2017). Our findings suggest that colistin resistance in pigs decreased when total colistin sales dropped, in agreement with previous studies (Randall et al., 2018). The use of colistin in pig production in Spain was constant until 2011, after which time colistin use decreased (from 29.38 mg/PCU in 2012 to 21.4 6 mg/PCU in 2013) (AEMPS, 2018). This reduction is parallel to the observed decline in colistin-resistant bacteria in our study. Furthermore, colistin sales for veterinary use peaked in 2014, whereas we observed the highest percentage of colistin-resistant bacteria in 2015 (no fecal samples from 2014 were available). Finally, according to the strategic plan "*Programa Reduce Colistina*" (AEMPS, 2018), colistin use in pigs has decreased to 22.02 mg/PCU (2016, the last data available) similar to our observed trend in the reduction of fecal samples positive for colistin-resistant bacteria, from 60% in 2015 to 35% in 2017.

In conclusion, there are a reduction in both the frequency of detectable colistin resistance carried by *Enterobacteriaceae* from the pig production system in Spain in 2017 and the use of colistin in husbandry animals (in the first semester of 2017, 9 mg/PCU in pigs) (AEMPS, 2018). Thus, the EMA recommendations and the Spanish program "Reduce colistina" concerning the reduction of colistin use that were implemented in 2016 would be playing an effective role in the fight against colistin resistance in pig production. Although longer studies are needed to confirm these trends, these promising efforts should be also implemented in other areas of animal husbandry to consolidate a "One Health" approach to fight against antimicrobial resistance.

Acknowledgement

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (AGL2016-74882-C3), the Spanish Ministry of Agriculture, Fishing, and Food, and the Autonomous Community of Madrid (S2013/ABI-2747). Pedro Miguela-Villoldo was supported by the FPI Program (BES-2017-080264) from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities. The authors also wish to thank the technicians María García, Estefanía Rivero, Nisrin Maasoumi, Celia Fernández, and Estefanía Martínez for their excellent technical assistance at the Foodborne Zoonoses and Antibiotic Resistance Unit.

References

AEMPS, 2018. Plan Nacional Resistencia Antibióticos. Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. pp. 1–165. Available from: http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0.

Cabal, A., Gomez-Barrero, S., Porrero, C., Barcena, C., Lopez, G., Canton, R., et al., 2013 Jul. Assessment of virulence factors characteristic of human Escherichia coli pathotypes and antimicrobial resistance in O157:H7 and non-O157:H7 isolates from livestock in Spain. Appl. Environ. Microbiol. 79 (13), 4170–4172.

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., et al., 2017 Aug. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro. Surveill. Bull. Eur. sur. Les Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 22 (31).

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA J. 16 (2). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182. (270 pp., ISSN: 1831-4732).

European Commission, 2013. Commission implementing decision 2013/652/EU on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. Off. J. Eur. Union 303, 26–39 (Luxembourg: Publications Office of the European Union).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018 Oct 31. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. [Internet. cited] Available from: https://mic.eucast.org/Eucast2/.

European Medicines Agency, 2013. Overview of comments received on "Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health". 44. pp. 25 July.

Garcia, V., Garcia-Menino, I., Mora, A., Flament-Simon, S.C., Diaz-Jimenez, D., Blanco, J.E., et al., 2018 Jul. Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli in Spain (2006-2017). Int. J. Antimicrob. Agents 52 (1), 104–108.

Hernandez, M., Iglesias, M.R., Rodriguez-Lazaro, D., Gallardo, A., Quijada, N., Miguela-Villoldo, P., et al., 2017 Aug. Co-occurrence of colistin-resistance genes mcr-1 and mcr-3 among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. Euro. Surveill. Bull. Eur. sur. Les Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 22 (31).

International Organization for Standardization (ISO), 2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Ref [Internet]. Available from. https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:20776:-2:ed-1:v1:en:term:3.11.

Li, J., Shi, X., Yin, W., Wang, Y., Shen, Z., Ding, S., et al., 2017. A multiplex SYBR green real-time PCR Assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples. Front. Microbiol. [Internet]. 8 (2078) Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5663727/.

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., et al., 2016 Feb 1. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. [Internet]. 16 (2), 161–168. Available from: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Moreno, M.A., 2014. Survey of quantitative antimicrobial consumption per production stage in farrow-to-finish pig farms in Spain. Vet. Rec. Open. 1 (1), e000002.

Plan Nacional Resistencia Antibióticos (PRAN), 2018. Internet. Available from. http://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-anual-2016-2017-plan-nacional-frente-resistencia-antibioticos.

Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017 Apr. Polymyxins: Antibacterial activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin. Microbiol. Rev. 30 (2), 557–596.

Quesada, A., Ugarte-Ruiz, M., Iglesias, M.R., Porrero, M.C., Martinez, R., Florez-Cuadrado, D., et al., 2016 Apr. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from poultry and swine in Spain. Res. Vet. Sci. 105, 134–135.

Randall, L.P., Horton, R.A., Lemma, F., Martelli, F., Duggett, N.A.D., Smith, R.P., et al., 2018 Aug. Longitudinal study on the occurrence in pigs of colistin-resistant Escherichia coli carrying mcr-1 following the cessation of use of colistin. J. Appl. Microbiol. 125 (2), 596–608.

Rebelo, A.R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J.S., Pedersen, S.K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I.M., et al., 2018 Feb 8. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. Eurosurveillance [Internet]. 23 (6), 17–00672. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5824125/.

Sun, J., Zeng, X., Li, X.-P., Liao, X.-P., Liu, Y.-H., Lin, J., 2017 Dec. Plasmid-mediated colistin resistance in animals: current status and future directions. Anim. Health Res. Rev. 18 (2), 136–152.

Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., et al., 2018 Jul. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae. Emerg. Microbes Infect. 7 (1), 122.

Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Lei, C.-W., Zhang, A.-Y., Wang, H.-N., 2018 Apr. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1791–1795.

antibiotics

MDPI

Communication

Carbapenemase-Producing Elizabethkingia Meningoseptica from Healthy Pigs Associated with Colistin Use in Spain

Pedro Miguela-Villoldo [1,2], Marta Hernández [3,4], Miguel Á. Moreno [1,2,*], David Rodríguez-Lázaro [4], Alberto Quesada [5,6], Lucas Domínguez [1,2] and María Ugarte-Ruiz [1]

1 VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain
2 Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
3 Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, 47071 Valladolid, Spain
4 Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Burgos, 09001 Burgos, Spain
5 Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10003 Cáceres, Spain
6 INBIO G+C, Universidad de Extremadura, 10003 Cáceres, Spain
* Correspondence: mamoreno@ucm.es; Tel.: +34-913-943-705; Fax: +34-913-943-795

Received: 20 August 2019; Accepted: 6 September 2019; Published: 11 September 2019



Abstract: Carbapenems are considered last-resort antimicrobials, especially for treating infections involving multidrug-resistant Gram-negative bacteria. In recent years, extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria have become widespread in hospitals, community settings, and the environment, reducing the range of effective therapeutic alternatives. The use of colistin to treat infection caused by these multi-drug bacteria may favour the selection and persistence of carbapenem-resistant bacteria. In this study, it is described, for the first time to our knowledge, a carbapenemase-producing isolate of *Elizabethkingia meningoseptica* from healthy pigs in Spain. The isolate we report was recovered during a study to detect colistin-resistant bacteria from faecal samples of healthy food-production animals using a chromogenic selective medium. Unexpectedly, we found an isolate of *Elizabethkingia meningoseptica* with high Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values for several antibiotics tested. Molecular analysis did not show any *mcr* family genes related with colistin resistance, but two carbapenemase genes, $bla_{\text{B-12_1}}$ and $bla_{\text{GOB-17_1}}$, were detected. This finding in healthy animals could suggest that colistin may favour the selection and persistence of carbapenem-resistant bacteria.

Keywords: carbapenemase; colistin; *Elizabethkingia meningoseptica*; Antimicrobial resistance

Carbapenems are considered last-resort antimicrobials, especially for treating infections involving multidrug-resistant Gram-negative bacteria [1]. In recent years, extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria have become widespread in hospitals, community settings and the environment, reducing the range of effective therapeutic alternatives [1]. The most common carbapenemases include metallo-β-lactamases (MBLs), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) and class D oxacillinases [1]. Since the first detection in 2011 in Germany, various European countries have reported carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* in food-producing animals [2]. In Spain, although described in pets and synanthropic animals [3,4], carbapenemase-producing *Escherichia coli* has not been detected in food-producing animals. To our knowledge, this is the first report of a carbapenemase-producing isolate of *Elizabethkingia meningoseptica* from healthy pigs in Spain.

Elizabethkingia species (genus formerly known as *Chryseobacterium*) are Gram-negative bacilli commonly found in freshwater, saltwater, soil and hospital environments [5]. Infections caused by *Elizabethkingia* spp., particularly *E. meningoseptica*, have been reported and are associated with a high fatality risk, particularly in immunocompromised patients [5].

The isolate we report was recovered during a study to detect colistin-resistant bacteria [6]. Antimicrobial chemotherapy, particularly colistin, has been the treatment of first choice to control Gram-negative bacteria in pig production, habitually used as a prophylactic [7]. Currently, the use of colistin is only allowed to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria and metaphylaxis [8]. To carry out this study, we used a chromogenic selective medium. Identification involved mass spectrometry using a Bruker Daltonics UltrafleXtrem MALDI TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and Whole Genome Sequencing (WGS) to confirm the species and to further characterize the isolate. *Elisabethkingia meningoseptica* isolate was, 99% identity (accession number: NZ_CP016378.1).

Phenotypic characterization of antimicrobial susceptibility was performed. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using a two-fold broth microdilution reference method, according to ISO 20776-1:2006 [9]. Due to broad resistance of the *Elisabethkingia* genus and the diverse therapeutic alternatives described in literature for infections associated with this bacterium, two different antimicrobial panels (EUVSEC and EUST) were used, covering different antimicrobial families commonly used for Gram-negative and Gram-positive bacteria (Trek Diagnostic Systems, US). The isolate showed a carbapenemase-producing profile: high MIC values for carbapenems (meropenem MIC = 16 mg/L; imipenem MIC = 16 mg/L; ertapenem MIC > 2 mg/L). This isolate also presented high MIC values for colistin (MIC > 16 mg/L), ampicillin (MIC > 64 mg/L), gentamicin (MIC = 32 mg/L), ceftazidime (MIC = 128 mg/L), and cefotaxime (MIC = 32 mg/L). These results agree with reports that *Elizabethkingia* species are resistant to polymyxins, tetracycline and, especially, β-lactams, including carbapenems, due to the production of chromosomal MBLs. Two types of MBLs have been identified in *E. meningoseptica* (BlaB and GOB), and both types of MBLs can be found in the same strain. BlaB-12 and GOB-17 have been reported in a clinical human isolate in Korea [5]. We tested antimicrobials usually employed to treat Gram-positive infections, notably vancomycin and rifampicin which have been used to treat human infections caused by *E. meningoseptica* [5]. Our isolate had a vancomycin MIC of 8 μg/mg and rifampicin MIC of 0.25 μg/mg.

We determined the whole genome sequence of the isolate. Sequencing libraries were prepared using the Nextera XT kit and sequenced on a MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) using v3 reagents with 2 × 300 cycles. The resistome of the draft genome was searched against ResFinder database [10] revealing two carbapenemase-encoding genes, $bla_{\text{B-12_1}}$ (98% identity) and $bla_{\text{GOB-17_1}}$ (100% identity). No other antimicrobial resistance genes were detected. The putative presence of plasmids was evaluated by BLASTn searches against the Plasmid Finder database [11]. No plasmids were found, indicating that the carbapenemase genes $bla_{\text{B-12_1}}$ and $bla_{\text{GOB-17_1}}$ were on the chromosome, consistent with what is commonly found for MBLs in this species [5]. Further analysis to confirm this finding are underway.

The presence of ESBL- and carbapenemase-producing *E. coli* in livestock has been associated with colistin resistance [1,12–14] and we observed in a previous study that Colistin-resistant *E. coli* in pigs has also been linked to colistin sales [6]. Colistin has been the treatment of first choice to control these bacteria in pig production and it has habitually used as a prophylactic approach as well [7]. Over the past decade, resistance to colistin has emerged becoming a public health problem mainly due to the spread of plasmid mobile genes in the *mcr* family. Thus, these colistin resistance genes could co-occur with ESBL and/or carbapenemase genes in the same isolate, promoting the co-selection. Because of that fact, these data suggest that colistin use may favour the selection and persistence of carbapenem-resistant bacteria. Further studies are needed to assess whether indeed colistin use in food animals, especially in pigs, is associated with a risk of co-selection of colistin, and more surprisingly, carbapenem resistance.

Author Contributions: Conceptualization, P.M.-V., M.A.M., L.D. and M.U.-R.; Methodology, P.M.-V., M.H., D.R.-L.; Software, M.H., D.R.-L. and A.Q.; Validation, M.H., D.R.-L. and A.Q.; Formal Analysis, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.-L., A.Q., L.D. and M.U.-R.; Investigation, P.M.-V., M.A.M., L.D. and M.U.-R.; Resources, P.M.-V., M.A.M., L.D. and M.U.-R.; Data Curation, P.M.-V., M.A.M., L.D. and M.U.-R.; Writing—Original Draft Preparation, P.M.-V., M.A.M., L.D. and M.U.-R.; Writing—Review & Editing, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.L., A.Q., L.D. and M.U.-R.; Visualization, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.-L., A.Q., L.D. and M.U.-R.; Supervision, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.-L., A.Q., L.D. and M.U.R.; Project Administration, P.M.-V., M.A.M., L.D. and M.U.-R.; Funding Acquisition, P.M.-V., M.A.M., L.D. and M.U.-R.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (AGL2016-74882-C3), the Spanish Ministry of Agriculture, Fishing, and Food, and the Autonomous Community of Madrid (S2013/ABI-2747). Pedro Miguela-Villoldo was supported by the FPI Program (BES-2017-080264) from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities.

Acknowledgments: The authors wish to thank the technicians María García, Estefanía Rivero, Nisrin Maasoumi and Estefanía Martínez for their excellent technical assistance at the Foodborne Zoonoses and Antibiotic Resistance Unit.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dandachi, I.; Chabou, S.; Daoud, Z.; Rolain, J.M. Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2299. [CrossRef] [PubMed]
2. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05182.
3. Gonzalez-Torralba, A.; Oteo, J.; Asenjo, A.; Bautista, V.; Fuentes, E.; Alos, J.I. Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Companion Dogs in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 2499–2501. [CrossRef] [PubMed]
4. Vergara, A.; Pitart, C.; Montalvo, T.; Roca, I.; Sabate, S.; Hurtado, J.C.; Planell, R.; Marco, F.; Ramírez, B.; Peracho, V. Prevalence of Extended-Spectrum-beta-Lactamase- and/or Carbapenemase-Producing Escherichia coli Isolated from Yellow-Legged Gulls from Barcelona, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02071-16. [PubMed]
5. Ceyhan, M.; Celik, M. Elizabethkingia meningosepticum (Chryseobacterium meningosepticum) Infections in Children. *Int. J. Pediatr.* **2011**, *2011*, 215237. [CrossRef] [PubMed]
6. Miguela-Villoldo, P.; Hernández, M.; Moreno, M.A.; Rodríguez-Lázaro, D.; Quesada, A.; Domínguez, L.; Ugarte-Ruiz, M. National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *123*, 141–143. [CrossRef] [PubMed]
7. Moreno, M.A. Survey of quantitative antimicrobial consumption per production stage in farrow-to-finish pig farms in Spain. *Vet. Rec. Open* **2014**, *1*, e000002. [CrossRef] [PubMed]
8. European Medicines Agency. *Updated Advice on the Use of Colistin Products in Animals within the European Union: Development of Resistance and Possible Impact on Human and Animal Health*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2016.
9. International Organization for Standarization (ISO). *CLinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Test Systems—Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices—Part 1: Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases*; ISO 20776-1:2006; International Organization for Standarization: Geneva, Switzerland, 2006.
10. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644. [CrossRef] [PubMed]
11. Carattoli, A.; Zankari, E.; Garcia-Fernandez, A.; Voldby Larsen, M.; Lund, O.; Villa, L.; Aarestrup, F.M.; Hasman, H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3895–3903. [CrossRef] [PubMed]
12. Garcia, V.; Garcia-Menino, I.; Mora, A.; Flament-Simon, S.C.; Diaz-Jimenez, D.; Blanco, J.E.; Alonso, M.P.; Blanco, J. Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and

Shiga toxin-producing Escherichia coli in Spain (2006–2017). *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *52*, 104–108. [CrossRef] [PubMed]

13. Barragan-Prada, H.; Ruiz-Hueso, P.; Tedim, A.P.; Gonzalez-Candelas, F.; Galan, J.C.; Canton, R.; Morosini, M.I. Emergence and dissemination of colistin-resistant Klebsiella pneumoniae isolates expressing OXA-48 plus CTX-M-15 in patients not previously treated with colistin in a Spanish university hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *93*, 147–153. [CrossRef] [PubMed]
14. Pulss, S.; Semmler, T.; Prenger-Berninghoff, E.; Bauerfeind, R.; Ewers, C. First report of an Escherichia coli strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50*, 232–236. [CrossRef] [PubMed]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 09 November 2020
doi: 10.3389/fmicb.2020.572712

Complementarity of Selective Culture and qPCR for Colistin Resistance Screening in Fresh and Frozen Pig Cecum Samples

*Pedro Miguela-Villoldo[1,2], Miguel A. Moreno[1,2], Marta Hernández[3], David Rodríguez-Lázaro[4], Alejandro Gallardo[5], Carmen Borge[6], Alberto Quesada[5,7], Lucas Domínguez[1,2] and María Ugarte-Ruiz[1]**

[1] VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain, [2] Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain, [3] Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain, [4] Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Burgos, Spain, [5] Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain, [6] Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, [7] INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:
Kristina Kadlec, Independent Researcher, Wunstorf, Germany

Reviewed by:
Anusak Kerdsin, Kasetsart University, Thailand
Ye Feng, Zhejiang University, China

***Correspondence:**
María Ugarte-Ruiz
maria.ugarte@ucm.es

Specialty section:
This article was submitted to Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 15 June 2020
Accepted: 15 October 2020
Published: 09 November 2020

Citation:
Miguela-Villoldo P, Moreno MA, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Borge C, Quesada A, Domínguez L and Ugarte-Ruiz M (2020) Complementarity of Selective Culture and qPCR for Colistin Resistance Screening in Fresh and Frozen Pig Cecum Samples. Front. Microbiol. 11:572712. doi: 10.3389/fmicb.2020.572712

Retrospective studies involving the screening of frozen stored collections of samples are commonplace when a new threat emerges, but it has been demonstrated that the freeze-thaw process can affect bacterial viability. The study of colistin-resistant bacteria in human and animal samples is an example of this issue. In this study, we compared culture-based and PCR-based methods for analyzing relative occurrence and diversity of colistin-resistant bacteria in caecal samples to determine the most appropriate method for frozen samples. Thus, 272 samples from the caecal contents of healthy pigs were tested before and after a 6-month freezing period. A selective medium was used when traditional isolation of colistin-resistant bacteria was tested, while a real-time SYBR® Green I PCR assay was applied for *mcr-1* quantification. The number of samples with colistin-resistant isolates was higher in fresh samples (247/272) than in frozen ones (67/272) and showed a higher diversity of colistin-resistant genera. PCR identification of *mcr* colistin resistance genes evidenced that *mcr-1* was the most prevalent *mcr* gene and *mcr-2* was detected for the first time in pigs from Spanish animal production. The number of samples with *mcr-1*-carrying bacteria after a freezing period decreased, while real-time quantitation of the *mcr-1* gene showed similar values in frozen and fresh samples. Therefore, when frozen cecal samples need to be analyzed, molecular detection of DNA could be the best option to provide a highly representative frame of the initial population present in the sample, and culture-based methods might be a useful complement to study colistin resistance levels.

Keywords: freeze-thaw process, caecal samples, *mcr-1*, *mcr-2*, swine, antimicrobial resistance

INTRODUCTION

Retrospective studies involving the screening of stored frozen collections of isolates or, less frequently, biological samples are commonplace when a new microbiological threat emerges, and their aim is to test prior occurrences and features of the agent. One ongoing example is colistin-resistant bacteria in humans and animals. These isolates and samples usually belong to collections obtained in the past that have been kept frozen during a period of time. Temperature and time of storage are the most critical factors when a microbiological study is carried out with frozen material. In addition, the freeze-thaw process could be an important issue for bacterial recovery since it could dramatically affect bacterial survival because of the physical changes in the frozen material, assuming that at least a 74% decrease in cell viability may occur (Phalakornkule et al., 2017). This is of paramount importance when the aim is testing bacterial diversity of frozen samples, as previous studies have demonstrated that the freeze-thaw process can decrease bacterial diversity in the samples (Phalakornkule et al., 2017; Dorsaz et al., 2020). Therefore, the use of traditional methods, such as solid or liquid culture, could be challenging and may not provide representative data on the amount and diversity of bacteria in these samples prior to being frozen. On the other hand, DNA remains more stable after the freeze-thaw process as shown in different microbiome studies using Next Generation Sequencing (Bassis et al., 2017; Dorsaz et al., 2020). Similarly, the bacterial composition of stools was not dramatically affected after a freezing process using molecular methods, although this has been also associated with freezing conditions (Shao et al., 2012).

There are not many published studies that evaluate the effect of the freeze-thaw process comparing culture-based methods and molecular techniques as real-time PCR. Our work aims to evaluate how this process could affect the detection of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* in frozen samples. Since the first description of a plasmid-mediated colistin resistance determinant in 2015 (*mcr-1*), up to ten *mcr*-related genes have been described. However, *mcr-1* still remains as the most common colistin resistance determinant carried by plasmids since it is present worldwide, especially in *Escherichia coli* of human and animal origin (Khedher et al., 2020; Wang et al., 2020); therefore, in this study we took *mcr-1* as an indicator of acquired colistin resistance. Many retrospective studies screened colistin resistance (both bacteria and genes) over bacterial strain collections (Carattoli et al., 2017; Garcia et al., 2018; Migura-Garcia et al., 2019), but they were rarely performed on biological samples (Miguela-Villoldo et al., 2019).

To provide more accurate insights on colistin resistance emergence and evolution, an analysis of samples from past years is required. For this reason, we tested and compared two different protocols, commonly used in routine bacterial screening to detect antimicrobial-resistant bacteria (Alba et al., 2018): selective culture (using a specific method to isolate colistin-resistant *Enterobaceriaceae*) and quantitative real-time PCR (targeting the *mcr-1* gene), in a collection of cecal samples from pigs. We aimed to determine the most appropriate method for testing these samples after the freezing period. In addition, we assessed the effect of the freeze-thaw process on the bacterial diversity of colistin-resistant bacteria in fresh and frozen samples using a selective culture medium.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A total of 272 isolates from cecal contents of healthy pigs were sampled at slaughterhouses in different Spanish regions from September to December 2018. Feces were taken from the cecum, transported on ice (+4°C) and analyzed within 24 h by culture-based and molecular methods. Then, samples were diluted (1:10) in buffered peptone water and stored with glycerol at −40°C. Each sample was kept frozen for 6 months and analyzed again by the same methods.

Culture-Based Methods

Samples were analyzed as described in Miguela-Villoldo et al. (2019) using ChromID Colistin R agar (ColR) (bioMérieux, France). Briefly, ColR plates were inoculated with 50 μL of a 500-fold BHI diluted sample with colistin (10 μg disk in BHI broth) and were incubated at 37°C for 24 h. Three different-colored morphologies (pink-burgundy, green and white-colorless) could grow in ColR plates according to manufacturers' specifications. After incubation, one colony per morphology obtained in the ColR plate was subcultured in blood agar at 37°C for 24 h. The isolates obtained were identified by mass spectrometry using a Bruker Daltonics UltrafleXtrem MALDI TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Poorly identified isolates (score <2.3) were further analyzed by using the API® 20-E *Enterobacteriaceae* identification kit (bioMérieux) and the specific PCR (Cabal et al., 2013) for pink-burgundy colonies to confirm *E. coli* isolates (associated to this morphology). After identification, molecular characterization of the isolates was carried out by a conventional PCR to analyze the presence of colistin resistance *mcr* genes (*mcr-1* to 5) (Rebelo et al., 2018). As described in literature, *mcr-6* seems to be an endogenous gene from *Moraxella* spp., *mcr-7* was only described in *Klebsiella* spp., *mcr-8* was identified in *Klebsiella pneumoniae* and *Raoutella ornithinolitica* and *mcr-9* and *mcr-10* do not seem to confer resistance to colistin (Khedher et al., 2020; Wang et al., 2020). Therefore, we focused on genes *mcr-1* to 5 since they have been described in different bacterial genera and have not been linked to a particular bacterial group.

In this study, we differentiate two types of isolates depending on the nature of their resistance to colistin: the ACRB group that includes bacterial genera naturally sensitive to colistin that have acquired resistance mechanisms, and NCRB which is composed of those genera that have intrinsic resistance to colistin (Olaitan et al., 2014; Lepelletier et al., 2018).

Colistin MIC Determination From *mcr*-Carrying Bacteria

Colistin susceptibility testing was performed by the two-fold broth microdilution reference method according to ISO 20776–1:2019 (ISO 20776-1:2019, 2019) using Sensititre EUVSEC plates

(Trek Diagnostic Systems, United States) having a colistin range from 1 to 16 mg/L. Colistin resistant isolates where those having a minimal inhibitory concentrations (MIC) higher than 2 mg/mL (Spellerberg and Fedor, 2003).

DNA Extraction and Quantitative PCR

Direct DNA extraction from pig cecal samples was carried out using a commercial kit (FASTI001-1 FavorPrep Stool DNA Isolation Mini Kit, Favorgen-Europe, Vienna) and was coupled to a specific SYBR® Green I (Thermo Fisher Scientific, Vilnius) real-time PCR assay for quantitative detection of the *mcr-1* gene (qPCR) described previously by Li et al. (2017). PCRs were run on a thermal cycler CFX 96 (Bio-Rad). The specificity of the primers has been confirmed by melting curve analysis. Four μL of each DNA elute were run in triplicate. Samples were considered positive when quantitative values were higher than 1.00×10^2 per reaction (equivalent to 1.58×10^5 copies/100 mg cecal content).

Aiming to test the qPCR protocol, we conduct a recovery assay using spiked samples. We used a pool of 10 g of feces sampled from pigs that had never been treated with antimicrobials, which were confirmed as negative to *mcr-1* genes by qPCR. The sample was diluted 1:10 in saline water (0.085% NaCl) to a 100 mL final volume and then divided into four aliquots of 20 mL (named A1, A2, A3, and A4). Three of them were spiked using a *mcr-1* positive strain of *E. coli* at three different concentrations (A1: 10^6 CFU/mL; A2: 10^5 CFU/mL; A3: 10^4 CFU/mL), calculated from a 0.5 McFarland suspension (plate count of 5.3×10^7 CFU/mL), being the last (A4), used as negative control. Direct DNA extraction from all the samples was coupled with the *mcr-1* specific real-time PCR assay for quantitative detection of the *mcr-1* gene included in our protocol.

In addition, another quantitative PCR was performed to detect and quantify the amount of *E. coli* present in the sample using a published PCR that used as a target *uidA* gene (Cabal et al., 2013).

Statistical Analysis

The Shannon-Weaver index (H′) was calculated using results obtained after traditional culture to estimate genera diversity per sample (Spellerberg and Fedor, 2003):

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} p_i ln\, p_i$$

Where H′ is the biodiversity index, i is the genera and $p_i = n_i/N$: where n_i is the total number of organisms of a particular genus and N is the total number of organisms of all genera. We used 95% confidence intervals (95% CI) to compare both fresh and frozen sample diversity indexes.

Statistical methods were used to analyze the data obtained by qPCR and the culture method; Fisher's exact test was applied to compare the proportion of samples where *mcr-1*-carrying bacteria were obtained using a traditional culture method. In this case, at least one positive *mcr-1* isolate in the sample was needed to consider it positive, both in fresh and frozen samples. It was assumed that the freeze-thaw process had a significant effect on our results if p-value was less than 0.05. T-Test for two related samples was applied to analyze qPCR results. Data was previously normalized transforming it into Log_{10}. A difference was considered significant when p-value was less than 0.05.

RESULTS

Culture-Based Methods

Detection of Colistin-Resistant Bacteria

Colistin-resistant isolates were detected in 91% of fresh samples (247/272) and 24% of frozen-thawed samples (67/272) (p-value < 0.001). ACRB isolates were detected in 222/272 of fresh samples, (82%) and 60/272 of frozen-thawed samples (22%) (p-value < 0.001), whereas NCRB isolates were obtained from 140/272 of fresh samples (51%) and 12/272 of frozen-thawed samples (4%) (p-value < 0.001).

Regarding fresh samples, ACRB isolated genera were *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* and *Raoutella*. On the other hand, NCRB genera were *Morganella*, *Myroides*, *Proteus*, *Providencia*, and *Vibrio*. The diversity of genera found in fresh samples was estimated using Shannon-Weaver Index, obtaining a value of 1.496 (95% CI = [1.393, 1.599]). In these samples, *Escherichia* spp. was the most frequent genus identified (50% of fresh samples with bacterial growth had at least one *Escherichia* spp. isolate) (**Table 1**).

ACRB obtained in frozen samples included genera such us *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., and *Raoutella* spp. Meanwhile, NCRB were represented by *Morganella* spp., *Proteus* spp. and *Providencia* spp. Shannon-Weaver Index, taking into account the genera observed, obtaining a value of 1.064 (95%CI = [0.782, 1.34]). In this case, *Escherichia* spp. was also the most frequent bacterial genus (72% of frozen samples with bacterial growth had at least one *Escherichia* spp. isolate) (**Table 1**).

TABLE 1 | Bacterial genera recovered by the culture method from fresh and frozen samples.

	Fresh Samples (n = 272)	Frozen Samples (n = 272)
Bacteria genera	*N*	*N*
ARCB group		
Escherichia spp.	212	56
Klebsiella spp.	20	2
Citrobacter spp.	9	1
Raoutella spp.	7	2
Enterobacter spp.	6	2
Aeromonas spp.	3	0
NCRB		
Providencia spp.	84	7
Proteus spp.	61	7
Morganella spp.	17	1
Myroides spp.	1	0
Vibrio spp.	1	0

Up to three different genera could be grown in the same sample, thus, the table represents the number of samples where each genus has been detected. N: number of samples with bacterial growth. n: number of studied samples.

The minimum overlapping between confidence intervals of Shannon-Weaver indexes from both fresh samples ([1.393, 1.599]) and frozen samples ([0.782, 1.346]) showed that diversity decreased in samples after the freezing process.

Interestingly, our results showed that the freeze-thaw process affected ACRB and NCRB differently. While NCRB experimented a 92% decrease in the number of isolates obtained, ACRB only decreased by 77%. Finally, the freeze-thaw process decreased viability to 84% (from 486 to 78 in fresh and frozen samples, respectively).

Molecular Detection of *mcr* Genes in Isolates Recovered by the Culture Method

From a total of 272 cecal samples, *mcr* genes were identified in 77% (209/272) and 21% (57/272) of fresh and frozen ones, respectively. Similarly, while the *mcr-1* gene was detected in 51.4% (250/486) of the isolates obtained from fresh samples, *mcr-4* was identified in four, one of them in co-occurrence with *mcr-1* (*E. coli*), and *mcr-2* in one *E. coli* isolate. The proportion of *mcr*-carrying isolates in the ACRB group was 86.4 and 92.1% for fresh and frozen samples, respectively. Finally, no *mcr* gene was found in 40 putative ACRB isolates; colistin resistance in those cases may thus be due to other mechanism(s). The remaining 192 isolates lacking *mcr-1-5* genes were NCRB.

However, *mcr-1* was detected in 73.07% (57/78) of the isolates from frozen samples (including all genera detected), while *mcr-4* was identified in one *E. coli*, all of them being ACRB. The remaining 21 isolates were PCR-negative for the *mcr* genes tested (6 ACRB and 15 NCRB) (**Table 2**).

Colistin Susceptibility of *mcr*-Carrying Isolates

Colistin MIC values were checked in the 312 *mcr*-carrying isolates from both fresh and frozen samples (**Table 3**). From a total of 254 *mcr*-carrying ACRB isolates obtained from fresh samples, 168 (66.2%) had a MIC value of 4 μg/mL, 79 isolates (31.0%) 8 μg/mL, two isolates 16 μg/mL and two more a MIC higher than 16 μg/mL. Three *mcr-1* isolates showed a MIC of 2 μg/mL.

Regarding frozen samples, from a total of 58 *mcr*-carrying ACRB isolates, 28 (48.3%) showed a MIC of 4 μg/mL, 29 (50%) 8 μg/mL and one isolate more than 16 μg/mL.

Detection of *mcr-1* Isolates in Cecal Samples

As summary, from the 272 fresh samples tested, 208 (76%) showed a growth of *mcr*-1 positive bacteria, all of them being ACRB. On the other hand, 56 frozen samples (20%) showed growth of *mcr*-1 positive bacteria, all being ACRB as well. The total number of isolates testing positive to the *mcr*-1 gene, obtained in both fresh and frozen samples, can be seen in **Table 2**, taking into account that in each sample up to three different colony morphologies could be detected. Fisher's exact test provided a *p*-value of 0.0001 comparing results of *mcr*-1 positive samples in fresh and frozen samples, the difference observed being statistically significant.

Quantification of *mcr-1* by Real-Time PCR

Regarding the recovery assay, qPCR reaction was carried out with 91.27% efficiency, r^2 value of 0.999 and 85°C melt

TABLE 2 | Molecular detection of *mcr* genes (*mcr-1* to *5*) by conventional PCR.

	Fresh samples (272 samples, 486 isolates)						Frozen samples (272 samples, 78 isolates)					
	mcr-1	*mcr-2*	*mcr-4*	*mcr-1/mcr-4*	No *mcr*	Total	*mcr-1*	*mcr-2*	*mcr-4*	*mcr-1/mcr-4*	No *mcr*	Total
ACRB group												
Escherichia spp.	236	1	1	1	10	249	54	0	1	0	1	56
Klebsiella spp.	7	0	1	0	12	20	2	0	0	0	0	2
Citrobacter spp.	5	0	1	0	3	9	1	0	0	0	0	1
Raoutella spp.	1	0	0	0	6	7	0	0	0	0	2	2
Enterobacter spp.	0	0	0	0	6	6	0	0	0	0	2	2
Aeromonas spp.	0	0	0	0	3	3	NA	NA	NA	NA	NA	0
Total	249	1	3	1	40	294	57	0	1	0	5	63
ACRB mcr%	85.70	0.34	1.02	0.34	13.60		90.50		1.59		7.94	
mcr-carrying ACRB proportion						86.40%						92.10%
NCRB group												
Providencia spp.	0	0	0	0	105	105	0	0	0	0	7	7
Proteus spp.	0	0	0	0	68	68	0	0	0	0	7	7
Morganella spp.	0	0	0	0	17	17	0	0	0	0	1	1
Myroides spp.	0	0	0	0	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	0
Vibrio spp.	0	0	0	0	1	1	NA	NA	NA	NA	NA	0
Total	0	0	0	0	192	192	0	0	0	0	15	15
NCRB *mcr%*					100						100	
Total *mcr%*	51.2	0.21	0.62	0.21	47.74		73.08		1.28		25.64	

All isolates obtained from fresh and frozen samples are represented in this table, independently of the total number of samples. NA, "Not Applicable" values correspond to genera that have not been found in the sample, so no analysis could be applied. ACRB, Acquired colistin-resistance bacteria. NCRB, Natural colistin-resistance bacteria.

TABLE 3 | Distribution of colistin MIC values of *mcr*-carrying isolates obtained from both fresh and frozen samples.

		Number of isolates						
		Dilution test range: 1 – 16 μg/ml colistin MICs (μg/ml)						
	mcr pattern	≤1	2	4	8	16	>16	Total
Fresh samples	*mcr-1*	0	3	168	75	2	1	248
	mcr-2	0	0	0	1	0	0	1
	mcr-4	0	0	0	2	0	1	3
	mcr-1/mcr-4	0	0	0	1	0	0	1
	Total	0	3	168	79	2	2	254
Frozen samples	*mcr-1*	0	0	28	28	0	1	57
	mcr-2	0	0	0	0	0	0	0
	mcr-4	0	0	0	1	0	0	1
	mcr-1/mcr-4	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	28	29	0	1	58

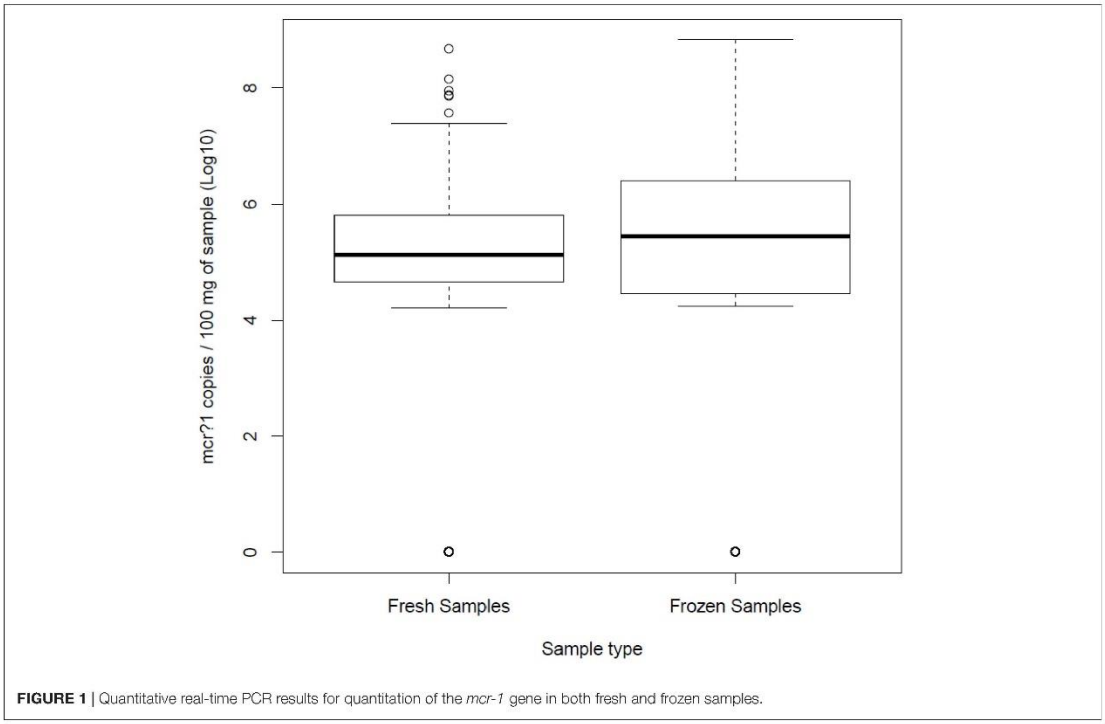


FIGURE 1 | Quantitative real-time PCR results for quantitation of the *mcr-1* gene in both fresh and frozen samples.

temperature. Cycle thresholds (cts) of the standard curve were 18.08 (sd = 0.113), 21.77 (sd = 0.174), 25.52 (sd = 0.135), 29.37 (sd = 0.266), and 32.98 (sd = 0.532) for standard 1 to 5, respectively. The results of the *mcr-1* qPCR were as follows: 7.22×10^9 copies/g, 8.08×10^8 copies/g, 9.22×10^7 copies/g and $< 10^1$ copies/g from A1, A2, A3, and A4, respectively, and a relative accuracy of 100.01%, 99.97% and 100.02% for A1, A2, and A3, respectively. These results agreed to those expected, taking into account that this test corresponds to a total *mcr-1* quantification.

The results of the *uidA* quantitative real-Time PCR were as follows: 1.60×10^{10} *uidA* copies/g, 6.43×10^9 *uidA* copies/g, 6.73×10^9 *uidA* copies/g, 3.96×10^9 *uidA* copies/g from A1, A2, A3, and A4, respectively.

From a total of 272 samples per group, the *mcr-1* gene was quantified in 128 fresh (47%) and 142 frozen samples (52%), with mean values of 4.75 Log_{10} copies/100 mg feces and 4.66 Log_{10} copies/100 mg feces, respectively (**Figure 1**), differences that were not statistically significant ($p = 0.508$, *T*-test).

Culture and PCR in Frozen Samples

From a total of 272 frozen samples analyzed, equivalent results were obtained from 176 samples (51 samples were positive, 125 were negative), whereas 96 showed discrepancies, mainly due to 91 samples that were quantified by qPCR but not detected by culture methods and only five samples were qPCR negative being positive by culture.

DISCUSSION

The freezing process could have a negative effect on the viability of bacteria present in cecal samples, which may affect retrospective studies based on the detection of bacteria using culture methods. In this study, we use freezing in glycerol to sample storage, a process involving physical and chemical changes that could affect their biological composition (Phalakornkule et al., 2017). Thawing-freezing is critical for bacterial viability and for decreasing their recoverability. The effect of this process must be considered in the study design, data analysis and interpretation of the results (Phalakornkule et al., 2017). In our study, fecal samples showed a higher diversity of colistin-resistant bacteria when tested prior to freezing, and a significant decrease was confirmed in both occurrence and diversity after freezing. Besides, the number of samples with colistin-resistant isolates was higher in fresh (247/272) than in frozen samples (67/272), according to the expected bacterial viability level after the freeze-thaw process previously described (Phalakornkule et al., 2017). Regarding both ACRB and NCRB groups, we noticed that the freeze-thaw process affected these two groups differently, since NCRB (192 in fresh samples vs. 15 in frozen samples) showed a higher decrease in the number of isolates obtained than ACRB (294 in fresh samples vs. 63 in frozen samples), although further analyses are needed to determine the cause. Our results showed that the freeze-thaw process drastically reduced bacterial viability, affecting some bacterial genera differently and altering the microbiological diversity of stored samples.

Regarding molecular detection of plasmid-mediated *mcr* genes, our results evidenced that *mcr-1* was the most prevalent colistin-resistance gene in our sample collection among the *mcr-1* to *mcr-5* group of determinants, in accordance with previous studies (Carattoli et al., 2017; Poirel et al., 2018; Migura-Garcia et al., 2020). We also identified *mcr-2* and *mcr-4* genes. To our knowledge, we report the first description of *mcr-2* in healthy pigs for food production in Spain and the second in Europe after its discovery in Belgium in 2016 (Xavier et al., 2016). This gene was identified in one *E. coli* (serotype O83:H42) belonging to ST-648 and showing 100% similarity to *mcr-2.1* described previously (Xavier et al., 2016). Most of these *mcr*-carrying isolates showed a colistin MIC value higher than 2, being 4 and 8 μg/mL the two most frequent MICs detected, as described in other studies (Xavier et al., 2016; Carattoli et al., 2017; Poirel et al., 2017; Lepelletier et al., 2018).

In this study, we compared both molecular and culture-based methods, focusing on those samples showing growth of ACRB carrying *mcr-1*, the main colistin-resistance determinant that has been quantified by SYBR® Green qPCR. The amount of *mcr-1* gene detected was similar between frozen and fresh samples, suggesting that the freeze-thaw process did not significantly modify the availability of functional DNA for the qPCR, in line with other studies that compared PCR results before and during different freezing periods (Bassis et al., 2017; Dorsaz et al., 2020). However, PCR may overestimate the content in viable cells showing colistin resistance of cecal samples, since dead cells could also be detected (Dorsaz et al., 2020).

Regarding samples with *mcr-1* positive isolates, freezing significantly decreases bacterial viability, while *mcr-1* DNA remained stable as detected by qPCR (**Figure 1**). This suggests that the use of culture-based methods for testing frozen samples might underestimate the occurrence of plasmidic colistin-resistance determinants in cecal samples, as it could be observed when comparing qPCR data with culture data. However, these methods provided information about bacterial diversity of biological samples which could not be achieved by using qPCR. Therefore, although culture and molecular methods differ in properties to detect colistin resistance, and mainly the specificity to detect viable cells or the sensitivity to quantify functional DNA molecules, both methods are complementary techniques used to characterize biological samples depending on the objectives of the study; taking into account that, while bacterial viability decreases as a result of the freezing, the DNA concentration remained stable.

CONCLUSION

Data obtained from selective culture showed that both bacterial viability and diversity of colistin-resistant genera were reduced after the freeze-thaw process, involving the loss of members of the bacterial population that was initially present in the sample. In contrast, *mcr-1* detection by qPCR directly on fresh or frozen samples produced similar results. Thus, detection of DNA by qPCR when frozen samples need to be analyzed would be the option of choice to provide a highly representative frame of the spectrum of resistance determinants initially present in the sample, and culture-based methods would be the best complement to detect the carriage of viable and colistin-resistant cells.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because no animal was manipulated in this study, only samples of cecal content taken at slaughterhouse.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PM-V, MM, LD, and MU-R: conceptualization, investigation, resources, data curation, writing – original draft preparation, project administration, and funding acquisition. PM-V, MH, and DR-L: methodology. MH, DR-L, and AQ: software and validation. PM-V, MH, MM, DR-L, AQ, LD, and MU-R: formal analysis, writing – review and editing, visualization, and supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (AGL2016-74882-C3), the Spanish Ministry of Agriculture, Fishing, and Food, and the Autonomous Community of Madrid (S2013/ABI-2747). Pedro Miguela-Villoldo was supported by the FPI Programme (BES-2017-080264) from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities and Estefanía Martínez Fernández for a grant co-funded by European Social Fund and Youth Employment Initiative (YEI) (PEJ-2017-TL/BIO-7114). Work in the AQ lab is also funded by the Junta de Extremadura and FEDER (IB16073 and GR15075) in Spain.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technicians María García, Estefanía Rivero, Nisrin Maasoumi, and Estefanía Martínez for their excellent technical assistance at the Foodborne Zoonoses and Antibiotic Resistance Unit. We are also grateful to the reviewers for their useful suggestions.

REFERENCES

Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Franco, A., Feltrin, F., Ianzano, A., Caprioli, A., et al. (2018). Molecular epidemiology of mcr-encoded colistin resistance in *Enterobacteriaceae* from food-producing animals in Italy revealed through the EU harmonized antimicrobial resistance monitoring. *Front. Microbiol.* 9:1217. doi: 10.3389/fmicb.2018.01217

Bassis, C. M., Moore, N. M., Lolans, K., Seekatz, A. M., Weinstein, R. A., Young, V. B., et al. (2017). Comparison of stool versus rectal swab samples and storage conditions on bacterial community profiles. *BMC Microbiol.* 17:78. doi: 10.1186/s12866-017-0983-9

Cabal, A., Gómez-Barrero, S., Porrero, C., Bárcena, C., López, G., Cantón, R., et al. (2013). Assessment of virulence factors characteristic of human *Escherichia coli* pathotypes and antimicrobial resistance in O157:H7 and non-O157:H7 isolates from livestock in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4170–4172. doi: 10.1128/aem.00537-13

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22:30589.

Dorsaz, S., Charretier, Y., Girard, M., Gaïa, N., Leo, S., Schrenzel, J., et al. (2020). Changes in microbiota profiles after prolonged frozen storage of stool suspensions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:77. doi: 10.3389/fcimb.2020.00077

Garcia, V., Garcia-Menino, I., Mora, A., Flament-Simon, S. C., Diaz-Jimenez, D., Blanco, J. E., et al. (2018). Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Intern. J. Antimicrob. Agents* 52, 104–108. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.022

ISO 20776-1:2019 (2019). Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices — Part 1: Broth Micro-Dilution Reference Method for Testing the in Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases. Available online at: https://www.iso.org/standard/70464.html

Khedher, M. B., Baron, S. A., Riziki, T., Ruimy, R., Raoult, D., Diene, S. M., et al. (2020). Massive analysis of 64,628 bacterial genomes to decipher water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes? *Sci. Rep.* 10:5970.

Lepelletier, D., Bonnet, R., Plesiat, P., Nicolas-Chanoine, M. H., Berger-Carbonne, A., Chidiac, C., et al. (2018). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1) among *Enterobacteriaceae* strains: laboratory detection of resistance and measures to control its dissemination. *Med. Malad. Infect.* 48, 250–255. doi: 10.1016/j.medmal.2018.01.010

Li, J., Shi, X., Yin, W., Wang, Y., Shen, Z., Ding, S., et al. (2017). A multiplex SYBR green real-time PCR assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples. *Front. Microbiol.* 8:2078. doi: 10.3389/fmicb.2017.02078

Miguela-Villoldo, P., Hernández, M., Moreno, M. A., Rodríguez-Lázaro, D., Quesada, A., Domínguez, L., et al. (2019). National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. *Res. Vet. Sci.* 123, 141–143. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.01.010

Migura-Garcia, L., Gonzalez-Lopez, J. J., Martinez-Urtaza, J., Aguirre Sanchez, J. R., Moreno-Mingorance, A., Perez de Rozas, A., et al. (2019). mcr-Colistin resistance genes mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 plasmids in *Escherichia coli* of pigs and white stork in Spain. *Front. Microbiol.* 10:3072.

Migura-Garcia, L., González-López, J. J., Martinez-Urtaza, J., Aguirre Sánchez, J. R., Moreno-Mingorance, A., Perez de Rozas, A., et al. (2020). mcr-Colistin resistance genes mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 plasmids in *Escherichia coli* of pigs and white stork in Spain. *Front. Microbiol.* 10:3072. doi: 10.3389/fmicb.2019.03072

Olaitan, A. O., Morand, S., and Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5:643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643

Phalakornkule, C., Nuchdang, S., Khemkhao, M., Mhuantong, W., Wongwilaiwalin, S., Tangphatsornruang, S., et al. (2017). Effect of freeze–thaw process on physical properties, microbial activities and population structures of anaerobic sludge. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 474–481. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.11.005

Poirel, L., Jayol, A., and Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 557–596. doi: 10.1128/cmr.00064-16

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., et al. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 6, 1–2.

Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., et al. (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 Surveill.* 23:17.

Shao, W., Khin, S., and Kopp, W. C. (2012). Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreserv. Biobank.* 10, 4–11. doi: 10.1089/bio.2011.0016

Spellerberg, I. F., and Fedor, P. J. (2003). A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and

the 'Shannon–Wiener' Index. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 12, 177–179. doi: 10.1046/j.1466-822x.2003.00015.x

Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., and Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerg. Microb. Infect.* 9, 508–516. doi: 10.1080/22221751.2020.1732231

Xavier, B. B., Lammens, C., Ruhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., et al. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 21:30280. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Miguela-Villoldo, Moreno, Hernández, Rodríguez-Lázaro, Gallardo, Borge, Quesada, Domínguez and Ugarte-Ruiz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

antibiotics

MDPI

Article

Colistin Selection of the *Mcr-1* Gene in Broiler Chicken Intestinal Microbiota

Pedro Miguela-Villoldo [1,2], Miguel A. Moreno [1,2], Agustín Rebollada-Merino [1,3], Antonio Rodríguez-Bertos [1,3], Marta Hernández [4], David Rodríguez-Lázaro [5], Alejandro Gallardo [6], Alberto Quesada [6,7], Joaquín Goyache [1,2], Lucas Domínguez [1,2] and María Ugarte-Ruiz [1,*]

1 VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain; pedromig@ucm.es (P.M.-V.); mamoreno@ucm.es (M.A.M.); agusrebo@ucm.es (A.R.-M.); arbertos@ucm.es (A.R.-B.); jgoyache@ucm.es (J.G.); lucasdo@visavet.ucm.es (L.D.)
2 Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain
3 Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain
4 Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Ctra. Burgos Km. 119, 47071 Valladolid, Spain; ita-HerPerMa@itacyl.es
5 Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, Spain; drlazaro@ubu.es
6 Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad s/n, 10003 Caceres, Spain; alexgsoler@unex.es (A.G.); aquesada@unex.es (A.Q.)
7 INBIO G+C, Universidad de Extremadura, 0004 Caceres, Spain
* Correspondence: maria.ugarte@ucm.es; Tel.: +34-913-944-097; Fax: +34-913-943-795

Abstract: Colistin has a long story of safe use in animals for the treatment and prevention of certain bacterial diseases. Nevertheless, the first description of the *mcr-1* gene showed that colistin resistance can spread by horizontal gene transfer and changed the landscape. This study aimed to assess the effect of colistin administration on the dispersion of resistance in the microbiota of day-old broiler chicks and how the presence of *mcr-1* genes influences the spread of colistin resistance determinants. In this study, 100 one-day-old chicks were divided into four groups of 25 animals (G1, G2, G3, and G4). Animals from G3/G4 were challenged with *mcr-1*-carrying *Salmonella* (day 7), while colistin (600 mg/L) was administered daily to G2/G4 animals through drinking water (from day 8 to day 15). Two quantitative PCR assays were performed to compare the amount of *Salmonella* and *mcr-1* that were present in the caecal samples. We observed that levels of *mcr-1* were higher in G3/G4 animals, especially G4, due to the spread of *mcr-1*-carrying *Salmonella*. On day 21, *Salmonella* levels decreased in G4, reaching similar values as those for G3, but *mcr-1* levels remained significantly higher, suggesting that colistin may accelerate the spreading process when *mcr-1*-carrying bacteria reach the gut.

Keywords: colistin; *mcr-1*; *Salmonella*; in vivo assay; real-time PCR quantification; microbiota; chicks

check for updates

Citation: Miguela-Villoldo, P.; Moreno, M.A.; Rebollada-Merino, A.; Rodríguez-Bertos, A.; Hernández, M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Gallardo, A.; Quesada, A.; Goyache, J.; Domínguez, L.; et al. Colistin Selection of the *Mcr-1* Gene in Broiler Chicken Intestinal Microbiota. *Antibiotics* **2021**, *10*, 677. https://doi.org/10.3390/antibiotics10060677

Academic Editor: Mark A Holmes

Received: 7 May 2021
Accepted: 3 June 2021
Published: 5 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The gut microbiome constitutes a rich and diverse microbial ecosystem that influences host nutrition and physiology, developing important functions that are beneficial for host health [1]. The microbiota of new-born chicks, first colonised by bacteria of the facultative anaerobic *Proteobacteria* phylum, progressively changes during the first 19 days of life [2]. Commensal *Enterobacteriaceae* is a major constituent of *Proteobacteria* and plays an important role in the protection of the gut against colonisation by pathogens, such as *Salmonella enterica* (especially serovars Typhimurium and Enteritidis), obligate anaerobic spore-forming bacteria, such as *Clostridia* species, and facultative anaerobic

bacteria from the *Streptococcus* and *Staphylococcus* genera [3]. However, *Proteobacteria*, especially *Enterobacteriaceae*, play a critical role in the emergence and maintenance of antimicrobial resistance, as the genes responsible are more prone to be found in this phylum (and also in *Firmicutes*) than in other phyla of the gut microbiome [4]. For example, plasmid-encoded resistance genes can move between gut bacteria via horizontal gene transfer. Thus, commensal *Enterobacteriaceae* become an excellent reservoir for antimicrobial resistance genes, making them accessible to other pathogenic or commensal bacteria [4,5].

Antimicrobial resistance is a public health concern worldwide and has become an increasing threat to human and animal health over the last decade, limiting the therapeutic alternatives available to treat infections caused by multidrug-resistant (MDR) pathogens. The increase of human infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria, especially those producing extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases, has forced the reintroduction of colistin to treat infections caused by these microorganisms in human medicine, as it is often the only effective antimicrobial against them [6–8]. Consequently, colistin has been classified among the antibiotic groups with activity against "Critical Priority" or "High Priority" pathogens identified by the World Health Organisation (WHO) [9] and is considered to be the last line to treat these infections.

The prevalence of colistin resistance in *Enterobacteriaceae* from food animals has been increasing annually and is thought to be related to the use of colistin in veterinary medicine on a global scale [10,11]. Colistin has been used for decades in animals to treat and prevent infectious diseases [6,12,13], usually administered orally in feed or drinking water [14,15]. The Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) of the European Medicines Agency (EMA) has restricted the administration of colistin sulphate to poultry to 3 to 7 days to treat gastrointestinal infections [16].

Until 2015, all described colistin resistance mechanisms were related to chromosomal point mutations, mainly involving the two-component regulatory system (*pmrAB/phoPQ*) and its negative regulator *mgrB*. However, a new plasmid-mediated gene, called *mcr-1*, was first described in that year, which meant that horizontal transfer was possible [8,17]. Thus, due to the increase of colistin resistance and the emergence of the *mcr-1* gene, the EMA recommended minimising the use of colistin in animals in the European Union (EU) in 2016, aiming to limit its use to 5 mg/population correction unit (PCU) at the national level, with a desirable level of 1 mg/PCU [15]. Since then, colistin resistance levels have appeared to drop with the decrease in its use. We also observed this trend in a recent study carried out in Spain [18].

There have been no studies of the effects of colistin administration on the intestinal microbiota of the neonatal gut and its ability to select colistin-resistant bacteria. Thus, we aimed to assess the effect of colistin administration on the dispersion of resistance in the microbiota of day-old broiler chicks and how the presence of *mcr-1* genes influences the spread of colistin resistance determinants using a monophasic *Salmonella* Typhimurium strain carrying a *mcr-1* gene.

2. Results

2.1. Clinical Signs and Pathological Findings

Four animals (two animals from G1, one from G3, and one from G4) died during the first week during the adjustment period. Post-mortem examination revealed fibrinous pericarditis and perihepatitis (septicaemic colibacillosis) as the cause of death. We collected samples from these animals, as their deaths occurred the day before the first sampling. Thus, none of the samples were excluded from the experiment. There were no significant changes found in any animal included in the study during the post-mortem examinations throughout the experiment.

2.2. Salmonella Counts in the Chick Samples

The amount of *Salmonella* in the chick caecal samples was estimated by plate count. Only animals from the *Salmonella*-challenged groups (G3 and G4) showed growth of

Salmonella on SMID2 plates (Figure 1). The mean values were non-statistically different ($p < 0.05$): from <5.4 $\times$ 10^1 to 1.2 $\times$ 10^5 CFU/mg (mean of 2.0 $\times$ 10^4 CFU/mg) for G3 (without colistin) and from <5.4 $\times$ 10^1 to 3.6 $\times$ 10^5 CFU/mg (mean of 2.3 $\times$ 10^4 CFU/mg) for G4 (colistin treated). Chicks from G4 had higher *Salmonella* counts from D9 to D14, at which time G4 reached the highest value. Finally, after the withdrawal of colistin (D14), both G3 and G4 showed similar CFU counts on D21 (Figure 1). All recovered *Salmonella* isolates were *mcr-1*-positive by conventional PCR.

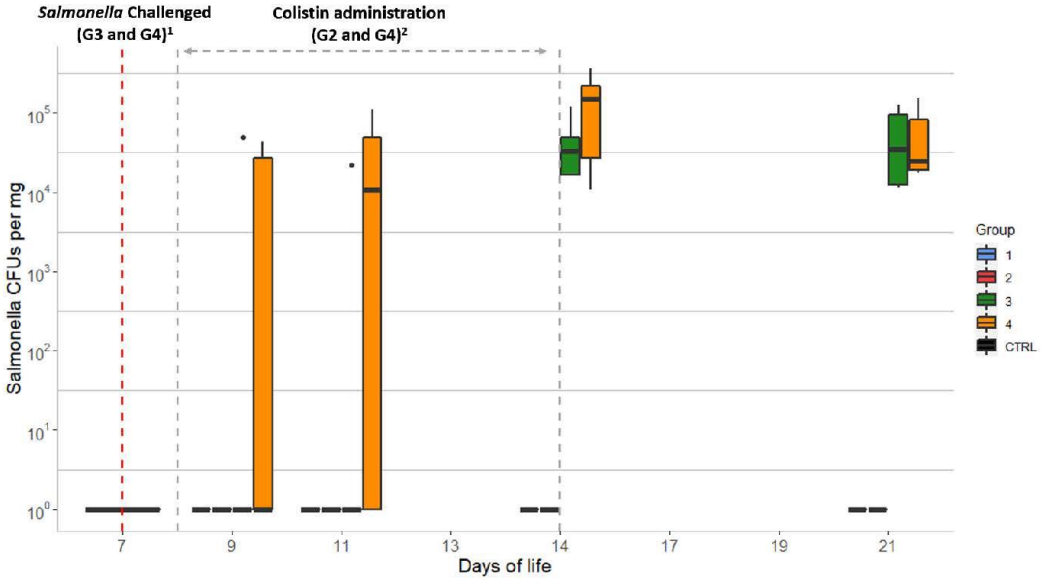


Figure 1. Evolution of *Salmonella* counts over 21 days in chick caecal samples: CTRL: control group; Group 1 (G1): animals without colistin nor *Salmonella* challenge; Group 2 (G2): colistin administered; Group 3 (G3): *Salmonella* challenged; Group 4 (G4): colistin administered and *Salmonella* challenged. Dots represent outliers; [1] *Salmonella* challenge started at D7 for groups G3 and G4 (sampling from D7 was performed before the challenge was started); [2] Colistin was provided to chicks from groups G2 and G4 from D8 to D14.

2.3. Quantitative qPCR of the mcr-1 Gene

In total, 87 of 100 caecal samples were analysed on D7 (7, 20, 20, 20, and 20 samples from the control group, G1, G2, G3, and G4, respectively). Overall, 13 samples were excluded because it was impossible to obtain enough samples (at least 100 mg) for DNA extraction.

Quantitative PCR data for the *mcr-1* gene of the 7 animals from the CTRL group and 21 animals from G1 (neither receiving colistin nor challenged with *Salmonella*) showed high inter-individual variability. Two animals from the CTRL group showed the barely detectable presence of the *mcr-1* gene, which remained below the quantification limit, and four animals from G1 showed quantifiable levels ranging from 6.7 $\times$ 10^3 to 1.6 $\times$ 10^6 *mcr-1* gene copies per mg caecal content, establishing a slight background. The remaining 17 chicks showed no qPCR signals or showed *mcr-1* values below the quantitation limit. The values for the *mcr-1* levels from the groups not challenged with *Salmonella* (G1 and G2) remained similar throughout most of the study, reaching their peaks on D11 (3.2 $\times$ 10^5 and 2.6 $\times$ 10^6 gene copies per mg caecal content, respectively) (Table 1). Concerning the *Salmonella*-challenged groups (G3 and G4), chicks from G3 (colistin untreated) showed an increase from less than 1.0 $\times$ 10^2 to 1.9 $\times$ 10^5 *mcr-1* copies/mg from D9 to D21. The

number of *mcr-1* copies/mg for chicks from G4 (colistin treated) increased from 1.5×10^3 to 2.1×10^5 for the same period. The greatest differences between the four groups were observed on D11 and D14, coinciding with the end of colistin administration, with G4 showing significantly higher *mcr-1* values, as the median of these values was outside the interquartile range of the other groups (Figure 2). In addition, chickens from G1 and G2 showed a non-significant increase in the median from D9 to D21 ($p = 0.23$), whereas *mcr-1* levels increased throughout the study in the challenged groups, G3 and G4.

Table 1. Quantitative PCR data for *mcr-1* gene copies/mg per day of life (expressed in Log10).

			***mcr-1* Gene Copies/mg (Expressed in Log10)**									
	SC (D7)	**CA (D8)**	**Day 7 [1]**		**Day 9**		**Day 11**		**Day 14**		**Day 21**	
			$\bar{x}$	**Me**	$\bar{x}$	**Me**	$\bar{x}$	**Me**	$\bar{x}$	**Me**	$\bar{x}$	**Me**
CTRL [2]	No	No	2.07	<2.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
G1	No	No	NA	NA	2.49	2.60	5.51	2.52	3.83	2.47	3.24	<2.0
G2	No	Yes	NA	NA	<2.0	<2.0	6.43	2.75	3.67	<2.0	2.60	<2.0
G3	Yes	No	NA	NA	5.26	<2.0	4.47	2.90	5.32	5.24	5.47	5.29
G4	Yes	Yes	NA	NA	4.23	3.02	5.46	5.38	6.37	6.01	5.68	5.34

SC (D7): *Salmonella* challenge (at day 7), CA (D8): Colistin administration (colistin treatment started at day 8), $\bar{x}$: Mean, Me: median; NA: data were not analysed due to the absence of animals; CTRL: control group; G1: animals without colistin nor *Salmonella* challenge; G2: colistin administered; G3: *Salmonella* challenged; G4: colistin administered and *Salmonella* challenged; [1] the CTRL samples were composed of a different number of animals due to the inability to obtain sufficient samples from 13 chicks. Five animals per group were sampled for the other days; [2] CTRL data only available for D7. After D7, chicks were considered from different groups (G1 to G4), depending on the experimental conditions.

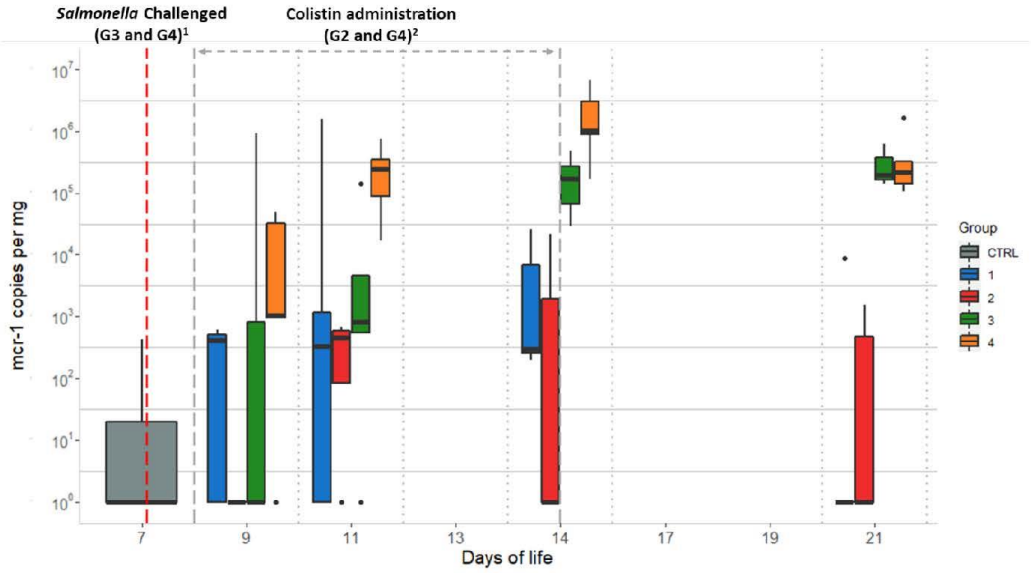


Figure 2. Quantitative qPCR data of *mcr-1* gene copies/mg obtained per day of life of the chicks for each studied group: Group 1 (G1): animals without colistin nor *Salmonella* challenge; Group 2 (G2): colistin administered; Group 3 (G3): *Salmonella* challenged; Group 4 (G4): colistin administered and *Salmonella* challenged. Dots represent outliers; [1] *Salmonella* challenge started at D7 for groups G3 and G4 (sampling from D7 was performed before starting the challenge); [2] Colistin was provided to chicks from groups G2 and G4 from D8 to D14.

2.4. Comparison of *Salmonella* Spp. and *mcr-1* Quantitative qPCR Data

Quantitative PCR data for *Salmonella* quantification for the groups, including chicks inoculated with *mcr-1*-carrying *Salmonella*, showed median values for G3 (without colistin) of $<3.3 \times 10^2$, 5.1×10^3, $1.5 \times 1\ 0^3$, 1.3×10^4, and 1.1×10^4 copies per mg for days 7, 9, 11, 14, and 21, respectively. For G4 (colistin administered), the corresponding median values were $<3.3 \times 10^2$, 1.7×10^3, 1.7×10^6, 4.7×10^4, and 1.6×10^4 copies/mg (Figure 3). Quantification of *mcr-1* and *Salmonella* showed similar values on D9 ($p < 0.05$, Table 2), indicating that most copies of the *mcr-1* genes in the samples came from the inoculated *S.* Typhimurium strain. The levels of *mcr-1* and *Salmonella* increased thereafter in G4, during the colistin administration period, whereas the levels remained approximately the same in G3. After the withdrawal of colistin, *Salmonella* levels in G4 decreased, reaching G3-equivalent values on D21. However, *mcr-1* levels of both groups remained significantly higher (Table 2), suggesting that *mcr-1* may have been transferred to other intestinal bacterial species (Figure 3).

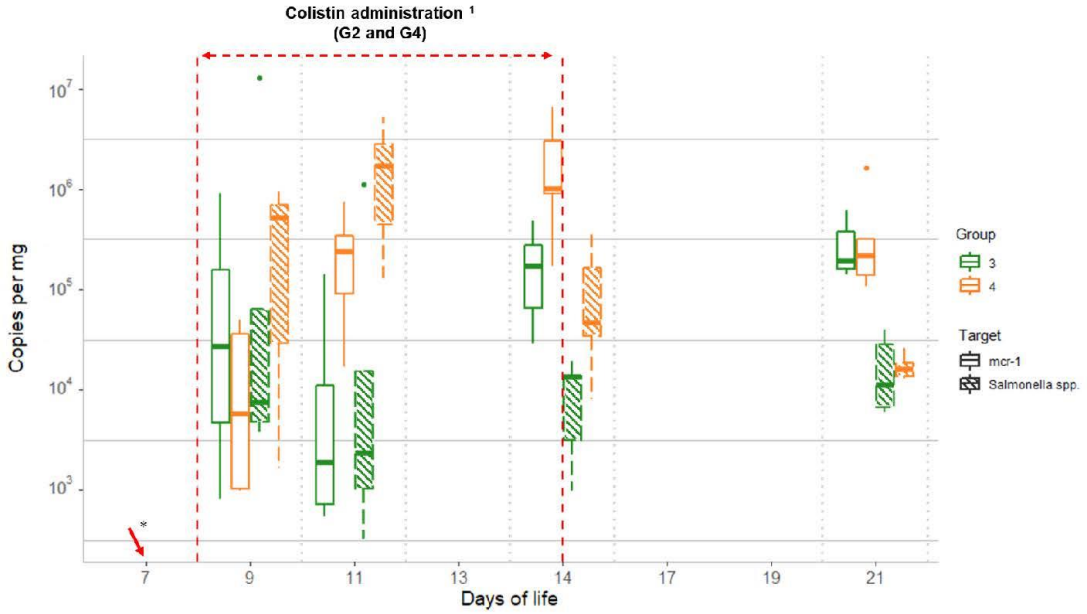


Figure 3. Comparison between qPCR data for *Salmonella* and *mcr-1* obtained throughout the study for the challenged groups (G3 and G4): Group 3 (G3): *Salmonella* challenged; Group 4 (G4): colistin administered and *Salmonella* challenged. Dots represent outliers; [1] Colistin was provided to chicks from group G4, from D8 to D14; * *Salmonella* challenge started on D7 for groups G3 and G4 (sampling from D7 was performed before starting the challenge).

Table 2. T-test *p*-values obtained from a comparative analysis of *mcr-1* and *Salmonella* qPCR quantitative data per sampling day.

		p-Values				
qPCR Data	**Group**	**D7**	**D9**	**D11**	**D14**	**D21**
mcr-1	G3 vs. G4	ND	0.41	0.03 *	0.02 *	0.86
Salmonella	G3 vs. G4	ND	0.69	0.02 *	0.03 *	0.69
mcr-1 vs. *Salmonella*	G3	ND	0.06	0.44 *	<0.01 *	<0.01 *
mcr-1 vs. *Salmonella*	G4	ND	0.94	<0.01 *	<0.01 *	<0.01 *

* Statistically significant differences ($p < 0.05$); G3: *Salmonella* challenged; G4: colistin administered and *Salmonella* challenged.; Sampling days: D7: day 7; D9: day 9; D11: day 11; D14: day 14; D21: day 21.; ND: The *t*-test was not applied for data from D7 due to the different number of samples available from each group.

3. Discussion

Food-producing animals have been highlighted as potential reservoirs for the dissemination of colistin-resistance determinants, especially since late 2015, when Liu et al. identified the plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1*, in China [17]. Horizontal gene transfer processes have been proposed to play a critical role in the spreading of the *mcr-1* gene [19,20]. In the present study, colistin administration had a significant effect on the spread of *mcr*-mediated colistin resistance in the chicks' microbiota. Its effect was greater when *mcr-1*-carrying bacteria were introduced into the gut environment in the presence of colistin, in which case *mcr-1* colistin resistance appeared to become widespread. We used a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain because neonatal chicks are highly susceptible to colonisation by *Salmonella* serovars [21] and it is easily identified in chicks because it is not a component of their early microbiota. We studied the effect of colistin by administering it for seven days, as recommended by the EMA for treatment of enteric infections caused by susceptible non-invasive *E. coli* [15], and focused on the *mcr-1* gene because it is the mobile gene most frequently related to colistin resistance worldwide [17].

This scenario has been described in other studies, in which a link was proposed between colistin use and the spread of the *mcr-1* gene [12,18,22]. Comparison of the two groups to which colistin was administered (G2 and G4) showed colistin treatment to significantly increase *mcr-1* levels in G4 (in which the chicks were challenged with *Salmonella*) but not G2 (in which the chicks were not challenged with *Salmonella*).

This study shows the importance of the presence of an intestinal bacterial population that carries the *mcr-1* gene for colistin resistance for the dispersion associated with its use. This is clear from the data of the *mcr-1* challenged chicks which were not administered colistin (G3). Chicks from non-challenged groups (G1 and G2) showed a baseline presence of *mcr-1* from the first day of sampling, which may have been due to the pre-existence of these genes in certain bacterial groups different from *Salmonella*. However, chicks from these groups (G1 and G2) showed parallel progression, with no significant differences in their *mcr-1* outcomes. Chicks from G3, despite not having been given colistin, showed an increase in *mcr-1* levels, which became significantly different from those of the animals from G1 and G2 by D14 and D21. Similarly, in assessing the effect of colistin administration, chicks challenged with *mcr-1*-carrying *Salmonella* (G4) showed significantly more (p-value < 0.01) *mcr-1* copies/mg relative to the non-challenged group (G2) (Figure 2), demonstrating that the presence of gene-carrying *Salmonella* in the gut is more decisive in gene dispersal than the effect of the antibiotic, as has been seen in other studies [23].

Salmonella counts in chicks from group G4 were higher than those in animals from group G3, as observed for the *Salmonella* qPCR results. Harbouring *mcr* genes usually suppose a negative fitness cost to the carrier bacteria [24] and maybe this fact was responsible for lower levels of *Salmonella* detected in G3 than those from G4, since *Salmonella* in G4 had a selective advantage because of colistin treatment. Thus, data from group G4 support the initial hypothesis about the effect of colistin use on the spread of colistin resistance caused by *mcr* family genes. These data are consistent with the high dispersion capacity of the *mcr-1* gene, especially in the presence of colistin, as previously described [12,13].

Therefore, the *mcr-1* levels of group G4 (colistin administered–*Salmonella* challenged) began to decline after exposure to colistin stopped, but slower than those of *Salmonella*, remaining similar to the values of group G3, which suggests that the reduction corresponded to *mcr-1* harboured by the *Salmonella* and that the remaining *mcr-1* quantified on D21 mainly came from other bacterial species of the microbiota that had been selected by the administration of colistin. Thus, our results highlight the possible horizontal transfer of genes from *Salmonella* to other intestinal bacteria, which may have allowed *mcr-1* levels to remain higher for a longer period in both groups (G3 and G4). Although the clonal spread of *mcr-1*-carrying *Salmonella* is common, there is a close association between certain serotypes of *Salmonella enterica*, as serovar Typhimurium, and *mcr-1* gene and different types of plasmid also play an important role in the conjugation phenomenon [8,25]. There-

fore, further studies are needed to determine the type of plasmid where *mcr-1* was located and confirm this hypothesis.

4. Methods

4.1. Ethical Approval

Experimental procedures were approved by the University Complutense of Madrid Animal Care and Ethics Committee (date of approval: 31/07/2019; registration number: 99/107262.9/19) in compliance with the regulations of the Community of Madrid (PROEX 152/19). Animal experiments took place in the biosafety level 3 (BSL-3) facilities of the VISAVET Health Surveillance Centre and animals were housed according to the European legislation on animal welfare (Directive 2010/63/EU).

4.2. Experimental Design

In total, 100 one-day-old broiler chicks (Ross 308) were obtained from a commercial hatchery and housed at the VISAVET Surveillance Centre facilities for the 21 days of the experiment under the same environmental conditions described previously by Herrero-Encinas et al. [26]. On the first day, when the animals arrived, box litter samples were collected for *Salmonella* spp. detection following ISO 6579:2017 standards. All samples were found negative. Chicks were divided into four groups of 25 animals. All chicks were housed in different cages until day (D) 7 but under the same environmental and feeding conditions. Thus, they were considered to be a single group for data analysis (control group: CTRL). From D7, chicks from each cage were exposed to different conditions to form four groups: animals without colistin nor *Salmonella* challenge (G1), colistin administered (G2), *Salmonella* challenged (G3), and colistin administered and *Salmonella* challenged (G4). On D7, chicks from G3 and G4 were challenged with a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (monophasic variant) strain that was positive for *mcr-1* through their drinking water (3.3×10^5 CFU/mL). Starting from D8, colistin (colistin sulphate 1,025,000 IU, Acolan, Spain) was administered for seven days to chickens of groups G2 and G4 through their drinking water (600 mg/L) adjusting it to a concentration of 75,000 IU recommended in poultry by the EMA [15], replacing the water and corresponding dose of colistin every 24 h.

4.3. Sampling and Sample Preparation

On days 7, 9, 11, 14, and 21, five randomly selected animals from each group (CTRL and G1 to G4) were sedated intramuscularly with diazepam and euthanised with an overdose of sodium pentobarbital by intraperitoneal injection. Caecum faeces were collected during the autopsy, and an aliquot of 1.5 g was stored at 4 °C for analysis using microbiological methods in the following 24 h. The remaining caecal faeces collected from each animal was preserved at −80 °C for molecular analysis.

Salmonella Counting Using Selective Media

A gram of each fresh aliquot was mixed with 2 mL saline (0.85% NaCl). Then, 50 µL was diluted into 9 mL brain–heart infusion broth (BHI) supplemented with a 10 µg colistin disk and incubated at 37 °C for 4 h. Then, six 10-fold serial dilutions were carried out in BHI. ChromID selective medium *Salmonella* Agar (SMID2) (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) was used for *Salmonella* counting. SMID2 plates were inoculated with 100 µL of −3 and −4 BHI sample dilutions and incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, all colonies suspected to be *Salmonella* were counted according to the manufacturer's specifications. One colony of each SMID2 plate was streaked onto blood agar plates and incubated at 37 °C for 24 h for subsequent species confirmation by mass spectrometry using a Bruker Daltonics UltrafleXtrem MALDI TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Conventional PCR was performed to confirm the presence of the *mcr-1* gene [27].

4.4. Quantitative Assay for Mcr-1

Direct DNA extraction from chick caecal samples was carried out using a commercial kit (FASTI001-1 FavorPrep Stool DNA Isolation Mini Kit, Favorgen-Europe, Vienna, Austria) following the manufacturer's specifications (elution volume of 200 µL), coupled with a specific SYBRGreen (Thermo Fisher Scientific, Vilnius) real-time PCR assay for quantitative detection of the *mcr-1* gene (qPCR), as described previously by Li J et al. [28] and further validated in our previous work [29]. Samples were considered positive if quantitative values were $>1.00 \times 10^2$ fg/µL (equivalent to 1.58×10^3 copies/mg caecal content).

4.5. Quantitative Real-Time PCR Assay for Salmonella

Quantitative real-time PCR was carried out for the quantitative detection of *Salmonella* spp. in each sample using a commercial "*Salmonella* spp. DNA extraction and real-time PCR detection" kit (Kylt® *Salmonella* spp. (FS), Oldenburg, Germany). Two microliters of each DNA elute were also run in triplicate. A sample was considered to be positive when its cycle threshold (CT) was $\leq$42.

4.6. Statistical Analysis

The data obtained by qPCR were analysed using a t-test for two related samples after normalisation by logarithmic transformation into Log10. A Kruskal–Wallis test was used to analyse differences in SMID2 *Salmonella* counts among experimental groups. A difference was considered significant when the *p*-value was <0.05 for both statistical tests.

4.7. Data Visualisation

All figures included in this study were illustrated with R (core team 2019) [30] using the ggplot2 package (H. Wickham, 2016) [31].

5. Conclusions

The presence of *mcr-1*-carrying *S. enterica* serovar Typhimurium in the gut resulted in the spread of the *mcr-1* gene, probably due to horizontal gene transfer. The administration of colistin accelerated this process by selecting the colistin-resistant bacteria present in the gut microbiota, keeping *mcr-1* levels constant after the withdrawal of colistin.

Author Contributions: Conceptualization, P.M.-V., M.A.M., L.D., and M.U.-R.; methodology, P.M.-V., A.R.-M., A.R.-B., M.H., and D.R.-L.; software, M.H., D.R.-L., and A.Q.; validation, M.H., D.R.-L., and A.Q.; formal analysis, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.-L., A.G., A.Q., J.G., L.D., and M.U.-R.; investigation P.M-V., M.A.M., L.D., and M.U-R.; resources, P.M-V., M.A.M., L.D., and M.U-R.; data curation, P.M.-V., M.A.M., L.D., and M.U.-R.; writing—original draft preparation, P.M.-V., M.A.M., L.D., and M.U.-R.; writing—review and editing, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.-L., A.G., A.Q., J.G., L.D., and M.U.-R.; visualization, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.-L., A.G., A.Q., J.G., L.D., and M.U.-R.; supervision, P.M.-V., M.H., M.A.M., D.R.-L., A.G., A.Q., J.G., L.D., and M.U.-R.; project administration, P.M.-V., M.A.M., L.D., and M.U.-R.; funding acquisition, P.M.-V., M.A.M., L.D., and M.U.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry, and Competitiveness (AGL2016-74882-C3), the Spanish Ministry of Agriculture, Fishing, and Food, and the Autonomous Community of Madrid (S2013/ABI-2747). Pedro Miguela-Villoldo was supported by the FPI Programme (BES-2017-080264) from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities and Estefanía Martínez Fernández by a grant co-funded by the European Social Fund and Youth Employment Initiative (YEI) (PEJ-2017-TL/BIO- 7114). Work in the laboratory of Alberto Quesada is also funded by the Junta de Extremadura and FEDER (IB16073 and GR15075) in Spain.

Institutional Review Board Statement: Experimental procedures were approved by the University Complutense of Madrid Animal Care and Ethics Committee (date of approval: 31/07/2019; registration number: 99/107262.9/19) in compliance with the regulations of the Community of Madrid (PROEX 152/19). Animal experiments took place in the biosafety level 3 (BSL-3) facilities of the VISAVET Health Surveillance Centre and animals were housed according to the European legislation on animal welfare (Directive 2010/63/EU).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors wish to thank the technicians María García, Estefanía Rivero, Nisrin Maasoumi, and Estefanía Martínez for their excellent technical assistance at the Foodborne Zoonoses and Antibiotic Resistance Unit, the staff of the Quality and Biosafety Unit, María Mazariegos, Laura Delgado, David Duque, and Pedro Alcubilla, for their technical support at the BSL3 facilities and Red de Investigación en Sanidad Animal (RISA).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rakoff-Nahoum, S.; Paglino, J.; Eslami-Varzaneh, F.; Edberg, S.; Medzhitov, R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell* **2004**, *118*, 229–241. [CrossRef] [PubMed]
2. Crhanova, M.; Hradecka, H.; Faldynova, M.; Matulova, M.; Havlickova, H.; Sisak, F.; Rychlik, I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 2755–2763. [CrossRef]
3. Litvak, Y.; Mon, K.K.Z.; Nguyen, H.; Chanthavixay, G.; Liou, M.; Velazquez, E.M.; Kutter, L.; Alcantara, M.A.; Byndloss, M.X.; Tiffany, C.R.; et al. Commensal Enterobacteriaceae Protect against Salmonella Colonization through Oxygen Competition. *Cell Host Microbe* **2019**, *25*, 128–139.e125. [CrossRef] [PubMed]
4. Hu, Y.; Yang, X.; Qin, J.; Lu, N.; Cheng, G.; Wu, N.; Pan, Y.; Li, J.; Zhu, L.; Wang, X.; et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2151. [CrossRef] [PubMed]
5. Sommer, M.O.A.; Dantas, G.; Church, G.M. Functional Characterization of the Antibiotic Resistance Reservoir in the Human Microflora. *Science* **2009**, *325*, 1128–1131. [CrossRef]
6. Catry, B.; Cavaleri, M.; Baptiste, K.; Grave, K.; Grein, K.; Holm, A.; Jukes, H.; Liebana, E.; Lopez Navas, A.; Mackay, D.; et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 297–306. [CrossRef]
7. Wang, X.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhang, S.; Shen, Z.; Wang, S. Emergence of the colistin resistance gene mcr-1 and its variant in several uncommon species of *Enterobacteriaceae* from commercial poultry farm surrounding environments. *Vet. Microbiol.* **2018**, *219*, 161–164. [CrossRef]
8. Lima, T.; Domingues, S.; Da Silva, G.J. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms* **2019**, *7*, 55. [CrossRef] [PubMed]
9. World Health Organization. WHO Model Lists of Essential Medicines. Available online: https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-use-of-essential-medicines/essential-medicines-lists (accessed on 26 April 2021).
10. Poirel, L.; Madec, J.Y.; Lupo, A.; Schink, A.K.; Kieffer, N.; Nordmann, P.; Schwarz, S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*. [CrossRef]
11. Borowiak, M.; Fischer, J.; Hammerl, J.A.; Hendriksen, R.S.; Szabo, I.; Malorny, B. Identification of 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.* **2017**, *72*, 3317–3324. [CrossRef]
12. Sun, J.; Zhang, H.; Liu, Y.H.; Feng, Y. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 794–808. [CrossRef] [PubMed]
13. Poirel, L.; Jayol, A.; Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 557–596. [CrossRef]
14. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J.* **2019**, *17*, 5598. [CrossRef]
15. Agency, E.M. Updated Advice on the Use of Colistin Products in Animals within the European Union: Development of Resistance and Possible Impact on Human and Animal Health. Available online: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en-0.pdf (accessed on 26 April 2021).
16. EMA/CVMP. Article 35. Community Interest Referral: Initiated in Cases Involving the Interests of the Community or Concerns Relating to the Protection of Human or Animal Health or the Environment. [European Commission Final Decision]. 2015. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/colistin-oral-article-35-referral-annex-i-ii-iii_en.pdf (accessed on 26 April 2021).
17. Liu, Y.Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168. [CrossRef]
18. Miguela-Villoldo, P.; Hernández, M.; Moreno, M.A.; Rodríguez-Lázaro, D.; Quesada, A.; Domínguez, L.; Ugarte-Ruiz, M. National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *123*, 141–143. [CrossRef]

19. Poirel, L.; Kieffer, N.; Nordmann, P. In Vitro Study of ISApl1-Mediated Mobilization of the Colistin Resistance Gene mcr-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00127-17. [CrossRef] [PubMed]
20. Sun, J.; Zeng, X.; Li, X.-P.; Liao, X.-P.; Liu, Y.-H.; Lin, J. Plasmid-mediated colistin resistance in animals: Current status and future directions. *Anim. Health Res. Rev.* **2017**, *18*, 136–152. [CrossRef]
21. Sadler, W.W.; Brownell, J.R.; Fanelli, M.J. Influence of Age and Inoculum Level on Shed Pattern of Salmonella typhimurium in Chickens. *Avian Dis.* **1969**, *13*, 793–803. [CrossRef]
22. Skov, R.L.; Monnet, D.L. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): Three months later, the story unfolds. *Euro Surveill. Eur. Commun. Dis. Bull.* **2016**, *21*, 30155. [CrossRef]
23. Ahmed, S.; Hansen, C.; Dahlkilde, A.L.; Herrero-Fresno, A.; Pedersen, K.S.; Nielsen, J.P.; Olsen, J.E. The Effect of Colistin Treatment on the Selection of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Weaner Pigs. *Antibiotics* **2021**, *10*, 465. [CrossRef] [PubMed]
24. Nang, S.C.; Morris, F.C.; McDonald, M.J.; Han, M.L.; Wang, J.; Strugnell, R.A.; Velkov, T.; Li, J. Fitness cost of mcr-1-mediated polymyxin resistance in Klebsiella pneumoniae. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1604–1610. [CrossRef]
25. Cui, M.; Zhang, J.; Zhang, C.; Li, R.; Wai-Chi Chan, E.; Wu, C.; Wu, C.; Chen, S. Distinct mechanisms of acquisition of mcr-1 -bearing plasmid by Salmonella strains recovered from animals and food samples. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13199. [CrossRef] [PubMed]
26. Herrero-Encinas, J.; Blanch, M.; Pastor, J.J.; Mereu, A.; Ipharraguerre, I.R.; Menoyo, D. Effects of a bioactive olive pomace extract from Olea europaea on growth performance, gut function, and intestinal microbiota in broiler chickens. *Poultry Sci.* **2020**, *99*, 2–10. [CrossRef] [PubMed]
27. Rebelo, A.R.; Bortolaia, V.; Kjeldgaard, J.S.; Pedersen, S.K.; Leekitcharoenphon, P.; Hansen, I.M.; Guerra, B.; Malorny, B.; Borowiak, M.; Hammerl, J.A.; et al. 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 Surveill. Eur. Commun. Dis. Bull.* **2018**, *23*, 17-00672. [CrossRef] [PubMed]
28. Li, J.; Shi, X.; Yin, W.; Wang, Y.; Shen, Z.; Ding, S.; Wang, S. A Multiplex SYBR Green Real-Time PCR Assay for the Detection of Three Colistin Resistance Genes from Cultured Bacteria, Feces, and Environment Samples. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2078. [CrossRef] [PubMed]
29. Miguela-Villoldo, P.; Moreno, M.A.; Hernández, M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Gallardo, A.; Borge, C.; Quesada, A.; Domínguez, L.; Ugarte-Ruiz, M. Complementarity of Selective Culture and qPCR for Colistin Resistance Screening in Fresh and Frozen Pig Cecum Samples. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 572712. [CrossRef] [PubMed]
30. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019; Available online: https://www.R-project.org/ (accessed on 26 April 2021).
31. Wickham, H. *ggplot2*; Use R! Springer International Publishing; Available online: https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-24277-4 (accessed on 26 April 2021).

Miguela-Villoldo *et al.*
Porcine Health Management (2022) 8:12
https://doi.org/10.1186/s40813-022-00255-0

Porcine Health Management

RESEARCH Open Access

Longitudinal study of the *mcr-1* gene prevalence in Spanish food-producing pigs from 1998 to 2021 and its relationship with the use of polymyxins

Pedro Miguela-Villoldo[1,2*], Miguel A. Moreno[1,2], David Rodríguez-Lázaro[3], Alejandro Gallardo[4], Marta Hernández[5], Tania Serrano[6], José L. Sáez[7], Cristina de Frutos[8], Montserrat Agüero[8], Alberto Quesada[4,9], Lucas Domínguez[1,2] and María Ugarte-Ruiz[1]

Abstract

Background: Resistance to colistin was an uncommon phenomenon traditionally linked to chromosome point mutations, but since the first description of a plasmid-mediated colistin-resistance in late 2015, transmissible resistance to colistin has become a Public Health concern. Despite colistin is considered as a human last resort antibiotic, it has been commonly used in swine industry to treat post-weaning diarrhoea in piglets. However, the progressively increase of colistin resistance during the last decade led to the Spanish Medicines and Healthcare Products Agency (AEMPS) to launch a strategic and voluntary plan aimed to reduce colistin consumption in pig production. Our longitudinal study (1998–2021) aimed to evaluate the trend of colistin resistance mediated through the *mcr-1* mobile gene in Spanish food-producing pig population and compare it with published polymyxin sales data in veterinary medicine to assess their possible relationships.

Results: The first *mcr-1* positive sample was observed in 2004, as all samples from 1998 and 2002 were *mcr-1* PCR-negative. We observed a progressive increase of positive samples from 2004 to 2015, when *mcr-1* detection reached its maximum peak (33/50; 66%). From 2017 (27/50; 54%) to 2021 (14/81; 17%) the trend became downward, reaching percentages significantly lower than the 2015 peak ($p < 0.001$). The abundance of *mcr-1* gene in PCR-positive samples showed a similar trend reaching the highest levels in 2015 (median: 6.6×10^4 *mcr-1* copies/mg of faeces), but decreased significantly from 2017 to 2019 (median 2.7×10^4, 1.2×10^3, 4.6×10^2 *mcr-1* copies/mg of faeces for 2017, 2018 and 2019, respectively), and stabilizing in 2021 (1.6×10^2 *mcr-1* copies/mg of faeces) with similar values than 2019.

Conclusions: Our study showed the decreasing trend of colistin resistance associated to *mcr-1* gene, after a previous increase from among 2004–2015, since the European Medicines Agency and AEMPS strategies were applied in 2016 to reduce colistin use in animals, suggesting a connection between polymyxin use and colistin resistance. Thus, these plans could have been effective in *mcr-1* reduction, reaching lower levels than those detected in samples collected 17 years ago, when resistance to colistin was not yet a major concern.

*Correspondence: pedromig@ucm.es
[1] VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords: Colistin, Antimicrobial resistance, Real-time PCR, Swine, Resistance genes

Background

Resistance to colistin, antibiotic belonging to polymyxins family, was traditionally linked to chromosome point mutations, but since the first description of a plasmid-mediated colistin-resistance mechanism mediated by a family of *mcr* genes on late 2015 [1], transmissible resistance to colistin has become a Public Health concern. Although up to ten members of this family have been described (*mcr-1* to *mcr-10*) [2–10], *mcr-1* is the most extended and frequently detected in many countries around the world [10–12], demonstrating it as an excellent indicator for monitoring colistin resistance [13].

The increase of human infections due to multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria, especially those producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and carbapenemases, coupled with the lack of the development of novel antimicrobials, led to the reintroduction of colistin by the mid-1990s to treat these human infections, as it was often the only effective antimicrobial against them [14]. Therefore, 3rd- and 4th-generation cephalosporins along with colistin, are considered as critically important for both human and animal health [15, 16] and they are recently classified into the "RESERVE" group in the World Health Organisation (WHO) AWaRe classification [17]. Nonetheless, colistin was extensively used to treat post-weaning diarrhoea (PWD) in piglets [18].

Thus, following the European Medicines Agency's (EMA) advice about the use of colistin in animals, the Spanish Medicines and Healthcare Products Agency (AEMPS) launched in 2016 the "*Reduce Porcino*" plan, a strategic and voluntary plan aimed to reduce the colistin consumption to 5 mg/PC in three years in pig production and control the possible alternative use of neomycin and apramycin. This initiative was followed by the 80% of Spanish pig producers contributing to a decrease in colistin consumption of 97% (AEMPS, 12/2019) [19].

A potential relationship between colistin resistance and polymyxins use has been pointed out [20–22], which is consistent with the findings observed in our previous studies [23], so the screening of levels of colistin-resistant bacteria has become an important procedure to assess the effectiveness of the reduction of antimicrobial use over colistin resistance. However, there is a lack of studies that jointly analyse the evolution of both colistin resistance and polymyxins use. So, we aimed to monitoring resistance to colistin mediated by the mobile *mcr-1* gene in the Spanish food-producing pig population and compare it with published data of polymyxins sales in veterinary medicine to assess their relationships.

Results

Detection of *mcr-1* in pig samples

The first *mcr-1* PCR-positive sample was observed in 2004 sampling, as all samples from 1998 and 2002 were *mcr-1* PCR-negative (Fig. 1). The percentage of positive samples increased from 2004 (8/50; 16%, 95% CI = 7.2% to 29.1%) until 2010 (22/50; 44%, 95% CI = 30.0% to 58.8%), showing a statistically significant difference ($p = 0.002$) between both years. From 2010 to 2013, it was noticed an irregular progression characterized by a slight decrease in the number of positive samples (no statistically significant), followed by a significant increase in 2015 ($p = 0.027$) compared to data from 2010. So, we observed an increase of positive samples from 2004 until 2015, when *mcr-1* PCR positive-samples reached its maximum value (33/50; 66%, 95% CI = 51.2% to 78.8%). Finally, from 2017 (27/50; 54%, 95% CI = 39.3% to 68.2%) to 2021 (9/50; 18%, 95% CI = 8.6% to 31.4%) the *mcr-1* PCR positive samples decreased, reaching percentages significantly lower than the 2015 peak ($p < 0.001$) and similar to years prior to 2008 (16/50; 32%, 95% CI = 19.5% to 46.7%) (Fig. 1).

These data were compared with the Spanish polymyxin sales data published in the Eleventh European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) Report [24] and a declining progression of both data series, especially since 2015, was noticed. Although the polymyxin sales showed a steeper drop than the *mcr-1* positive samples percentages, both decreasing trends suggest that the reduction of polymyxins sales could have had a strong influence on the decrease of *mcr-1* positive samples, among other factors (Fig. 1).

Abundance of *mcr-1* in pig samples

The abundance (copies/mg caecal content) of the *mcr-1* gene in those years with PCR-positive samples showed a similar trend to the percentage of *mcr-1* gene positive samples (Fig. 2). The median values from 2015 and 2017 were similar (6.6×10^4 and 2.7×10^4 *mcr-1* copies/mg, respectively), but the median of *mcr-1* gene quantification remarkably dropped in 2018 (1.2×10^3 *mcr-1* copies/mg; $p < 0.01$). This decrease continued in 2019 (median 4.6×10^2 *mcr-1* copies/mg) and it was stabilised in 2021 (median 1.6×10^2 *mcr-1* copies/mg). Thus, both indicators, the number of *mcr-1* positive samples and the

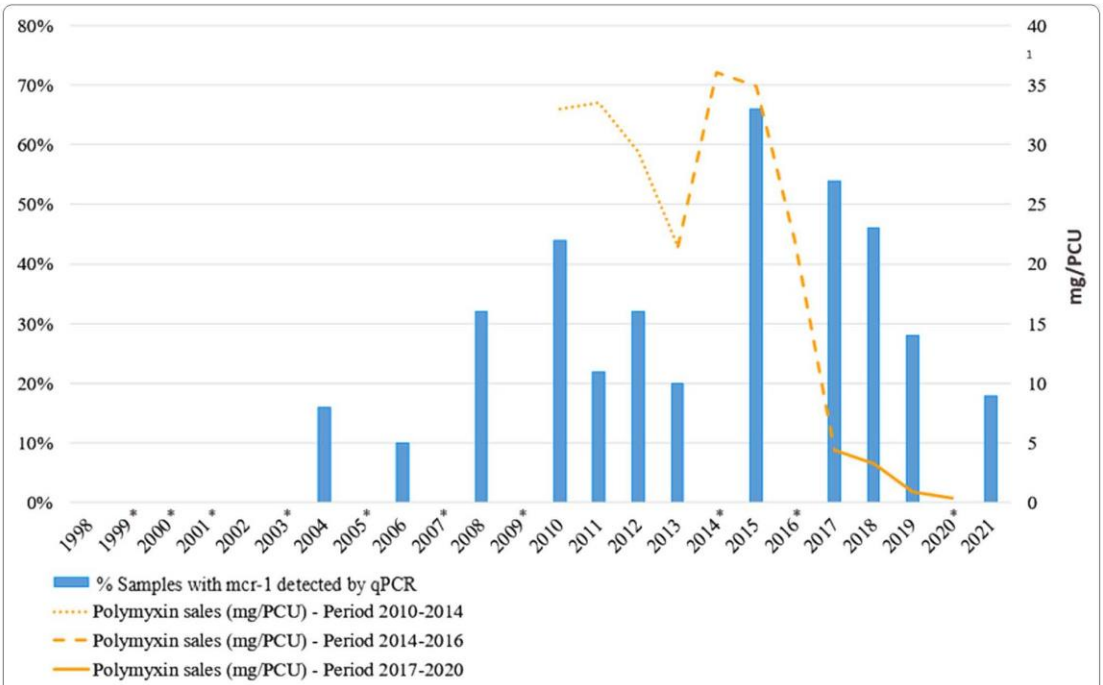


Fig. 1 Evolution of the percentage of pig samples positive to *mcr-1* gene and the polymyxin sales reported in Spain for veterinary medicine. Data on polymyxin sales were available from 2010 to 2020 (the latest year reported currently by ESVAC). These data was represented in three different periods with the same data collection system, as it was specified in the ESVAC report for spain. PCU: population correction unit. *No *mcr-1* gene prevalence dta in the years 1999, 2000, 2001, 2003, 2005, 2007, 2009, 2014, 2016 and 2020

amount of *mcr-1* copies, showed a similar decrease trend since 2015.

Discussion

Colistin resistance mediated by *mcr* mobile genes is a great concern around the world [25]. There are some studies reporting changes in the *mcr* abundance by culture and molecular analysis of bacterial isolates [26, 27], but only few studies have focused on samples rather than strains, such as livestock manure [28], human and pets faeces [29, 30] or faeces from food-producing animals [29]. Similarly, few studies have assessed the evolution of the presence of *mcr* genes in a given animal, food or human related environment along a large period of time. Consequently, the results obtained in our study may provide a new perspective on the spread of the *mcr-1* gene in the highly relevant bacterial context represented by the intestinal microbiota. However, since the effect of prolonged storage of fecal samples on the integrity of their DNA, which could be affected by chemical or enzymatic degradative processes, is unknown, its representativeness should be considered with caution, especially in the early stages of this study that reaches up to 23 years old.

We also compared the evolution of *mcr-1* presence in faecal samples with polymyxin use in animal production, which makes this work useful to assess the current decisions about colistin restrictions recommended in the European Union (EU). However, the Spanish antimicrobial sales data collection system detected under-reporting for the period 2010 – 2013, so the data for these years are underestimates. In addition, datasets included veterinary medicinal products (VMPs) declared by marketing authorisation holders (MAHs) which were replaced by retailers as sales data providers for the period 2017–2020. Due to these differences, it is difficult to assess the trends for the periods 2010–2014, 2014–2016 and 2017–2020, and comparisons between them should be made with caution [31]. Thus, these periods were assessed separately.

In accordance with the aim of the AEMPS colistin reduction programmes launched to decrease the use of colistin in different food-producing animal species such as swine [32], polymyxin sales in Spain dropped down

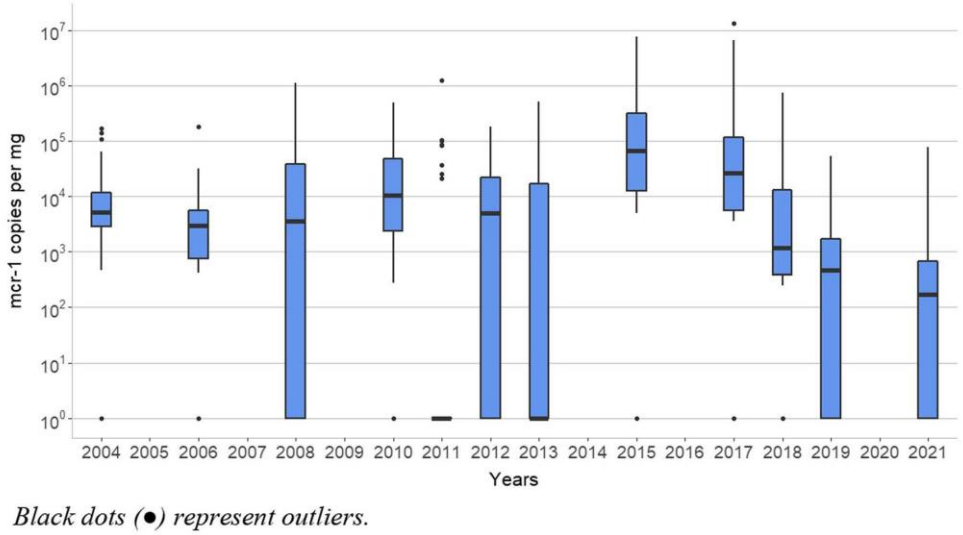


Fig. 2 Box-plot diagram of the yearly distribution of mcr-1 gene abundance (expressed in copies/mg faecal content) in Spanish food-producing pigs from positives caecal samples. Black dots represent outliers

from 22.02 mg/PCU in 2016 to 4.4 mg/PCU in 2017, 3.3 mg/PCU in 2018, 0.9 mg/PCU in 2019 and 0.4 mg/PCU in 2020, also achieving the EMA's main objective of reducing the antibiotic consume under 5 mg/PCU in a period of 3 to 4 years from 2016 [24, 33].

Interestingly, the first detection of *mcr-1* in pigs in Spain (2004) was coincidental with the suppression of zinc oxide (ZnO) as an additive food complement for feeding piglets during 2003–2004. ZnO has been used traditionally as a food additive in piglets; however, there was an increasing concern regarding the potential risk for the environment derived from its use. Thus, the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) of EMA considered that the benefits of using ZnO did not exceed the risks to the environment and consequently, this substance was banned in 2003 until the 15th November 2004, when ZnO was officially registered as a premix [34]. In addition, the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) of EU recommended, also in 2003, a reduction of ZnO levels in feeding-stuffs as they were higher than necessary to supply the physiological requirements of the animals [35]. During the ban, colistin emerged as an alternative to treat PWD in piglets and ZnO was mostly replaced by colistin. Interestingly, in the 2004–2010 period we observe an increase in the number of *mcr-1*-carrying samples which could be related with the widening use of this antibiotic.

The drop of *mcr-1* positive samples for the period 2011–2013 compared with 2010 was coincident with a reduction in the piglets' production in Spain, as it is represented in Fig. 1; however, the decrease of polymyxin sales could be more related with the changes in the antimicrobial sales data collection method above mentioned. In 2015, an increase of *mcr-1* positive samples was observed with the highest proportion of samples of our study. According to the antimicrobial sales data compiled by ESVAC, Spain had in 2015 the highest figures of polymyxins sales in the EU (34.9 mg/PCU) [33]; however, after the Spanish voluntary strategic plan launched by the AEMPS, polymyxin sales remarkably decrease in the next years (4.4, 3.3, 0.9 and 0.4 mg/PCU from 2017, 2018, 2019 and 2020 respectively) [24].

From 2017 to 2021, the percentage of *mcr-1*-positive samples decreased in agreement with the reduction in the polymyxin sales, reaching levels of colistin resistance lower than those obtained in 2008. This phenomenon has been observed in others UE countries, such as Italy [26], Germany [36] among others, where implemented strategies to limit the use of colistin also produced a parallel decrease between colistin resistance and antibiotic consume (data expressed in mg/kg of estimated biomass) in animals, especially pigs and poultry showing a statistically significant association [22]. Similar results has been also reported in China [20].

Our retrospective longitudinal study suggest that colistin resistance associated to *mcr-1* gene is related to polymyxins sales, as different studies [20, 26, 37] and authorities [22, 32, 38] have also pointed out. In this context, we observed a decrease in both colistin resistance and polymyxins sales in the 2017 to 2021 period, and the proportion of positive samples and the abundance of *mcr-1* gene in positive samples reached levels lower than those obtained even in 2004. This context reinforces the food-producing industry against future changes in animal care legislations, such as the next ZnO in the EU ban planned for 2022 which was approved in 2017 [39] and for which pig industry will be better prepared than 2003, when ZnO was mostly replaced by colistin and led us to the current situation.

Colistin resistance due to *mcr-1* gene showed a slower decrease than colistin sales probably due to the genetic environment where *mcr-1* gene was encoded. The genome location of *mcr-1* gene may play a determinant role in its dispersion and abundance [40–42]. The *mcr-1* gene is usually encoded in plasmids, allowing the horizontal gene transference and thus a faster spread of the resistance gene to other bacteria which become resistant to colistin [1, 37]. Hypothetically, reduced use of colistin would cause a drop in the selective pressure on the intestinal bacterial population. This would allow colistin susceptible bacteria to survive and outcompete colistin resistant bacteria, due to the fitness cost associated with maintaining plasmid-encoded genes [42, 43]. This hypothesis seems to be in concordance with data from the joint report by European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and EMA (Jiacra III report) [22]. However, there are evidences of the co-selection of *mcr* genes in a free colistin selective pressure environment in plasmid containing *mcr* genes and resistance genes against other antimicrobial families such as ESBL ($bla_{CTX\text{-}M}$ and bla_{SHV}), *cml* or *sul* (chloramphenicol and sulfamethoxazole resistance genes respectively) [44–47]. Another less frequent factor that could allow the persistence of colistin resistance in the host strain is the presence of *mcr-1* gene in the bacterium chromosome, usually flanked by insert sequences [40, 48]. Thus, the location of colistin resistance genes may be determinant in the fight against colistin resistance, which is an open window for further studies.

Conclusions

Our results showed a connection between polymyxin sales and colistin resistance in Spanish pigs for food-production in a range of nine years, and a decreasing trend of colistin resistance (*mcr-1* gene) since the EMA and AEMPS strategies were applied in 2016 to reduce colistin use in animals. Thus, our data suggest to the reduction plans would have had an important effect in the fight against colistin resistance (*mcr-1* gene), since its presence in pigs have returned to slightly lower levels than those detected in samples collected 17 years ago, when resistance to colistin was not yet a major concern.

Methods

Samples

The collection of caecal samples from healthy pigs taken at slaughterhouse level under the National antimicrobial resistance surveillance program (1998 to 2021), driven by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (except 2018) were used for this study. Sampling from 2018 was covered by the VISAVET Health Surveillance Centre, under the same conditions as the National antimicrobial surveillance programs to maintain the homogeneity of the sampling.

We have combined a retrospective study, based on frozen (ten-fold diluted in sterile water and glycerol prior to freezing at − 40 °C) samples collected from 1998 to 2017, with a prospective study done with fresh samples taken in 2018, 2019 and 2021.

We randomly selected 50 samples per year (1998, 2002, 2004, 2006, 2008, 2010, 2011, 2012, 2013, 2015, 2017, 2018, 2019 and 2021) accomplishing a total number of 700 samples.

Quantitative assay for *mcr-1*

Before processing, frozen samples were thawed at room temperature. From this step, all samples were processed in the same way. Direct DNA extraction was carried out using a commercial kit (FASTI001-1 FavorPrep Stool DNA Isolation Mini Kit, Favorgen-Europe, Vienna) following the manufacturer's specifications (elution volume of 200 µL), coupled to a specific SYBRGreen real-time PCR assay for quantitative detection of the *mcr-1* gene (qPCR), described previously [49] and further validated in our lab [13]. Samples were considered positive if their quantitative DNA values were $> 1.00 \times 10^2$ fg/µL, equivalent to 1.58×10^3 *mcr-1* copies/mg caecal content.

Statistical analysis

The data obtained by qPCR was analysed using a T-test after normalisation by logarithmic transformation into Log_{10}, and Chi-square test was used to compare the frequencies of *mcr-1* positive samples observed each year. A difference was considered significant when the p was < 0.05.

Abbreviations

AEMPS: Spanish Medicines and Healthcare Products Agency; CI: Confidence Interval; ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control; EFSA:

European Food Safety Authority; EMA: European Medicines Agency; ESBL: Extended-spectrum beta-lactamases; ESVAC: European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption; EU: European Union; MAHs: Marketing Authorisation Holders; MDR: Multidrug-resistant; PCR: Polymerase Chain Reaction; PCU: Population Correction Unit; PWD: Post-weaning diarrhoea; SCAN: Scientific Committee on Animal Nutrition; VMPs: Veterinary Medicinal Products; WHO: World Health Organisation; ZnO: Zinc oxide.

Acknowledgements
The authors wish to thank the technicians María García, Estefanía Rivero, Nisrin Maasoumi, and Claudia Renata Illas for their excellent technical assistance at the Foodborne Zoonoses and Antibiotic Resistance Unit and Red de Investigación en Sanidad Animal (RISA).

Authors' contributions
Conceptualization, PM-V, MM, LD, and MU-R; methodology, PM-V, TS, MH, and DR-L; software, PM-V, MH, DR-L, and AQ; validation, MH, DR-L, and AQ; formal analysis, PM-V, MH, MM, DR-L, AG, MA, CD-F, JS, AQ, LD, and MU-R; investigation PM-V, MM, LD, and MU-R; resources, PM-V, MM, LD, and MU-R; data curation, PM-V, MM, LD, and MU-R; writing—original draft preparation, PM-V, MM, LD, and MU-R; writing—review and editing, PM-V, MH, MM, DR-L, AG, TS, MA, CD-F, JS, AQ, LD, and MU-R; visualization, PM-V, MH, MM, DR-L, AG, TS, MA, CD-F, JS, AQ., LD, and MU-R; supervision, PM-V, MH, MM, DR-L, AG, TS, MA, CD-F, JS, AQ, LD, and MU-R; project administration, PM-V, MM, LD, and MU-R; funding acquisition, PM-V, MM, LD, and MU-R All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding
This research was supported by Grants AGL2016-74882-C3 and PID2020-118405RB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033, the Spanish Ministry of Agriculture, Fishing, and Food, and the Autonomous Community of Madrid (S2013/ABI-2747). Pedro Miguela-Villoldo was supported by the FPI Program (BES-2017-080264) from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities. Work in the laboratory of Alberto Quesada is also supported by Grants IB20181 and CTS059 funded by the "Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital, Junta de Extremadura and FEDER".

Availability of data and materials
All datasets used in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate
Not applicable.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Author details
[1]VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain. [2]Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain. [3]Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Burgos, Burgos, Spain. [4]Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain. [5]Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain. [6]Tecnologías y Servicios Agrarios S.A, Madrid, Spain. [7]Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, Spain. [8]Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Madrid, Spain. [9]INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain.

Received: 25 October 2021 Accepted: 21 January 2022
Published online: 17 March 2022

References

1. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161–8.
2. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 2016;21(27):30280.
3. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. MBio. 2017;8(3):e00543-e617.
4. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 2017;22(31):30589.
5. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of 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. 2017;72(12):3317–24.
6. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. J Antimicrob Chemother. 2017;72(10):2745–9.
7. Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2018;73(7):1791–5.
8. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):122.
9. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolate. MBio. 2019;10(3):e00853-e919.
10. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):508–16.
11. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. Eurosurveillance. 2016;21(9):30155.
12. García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Díaz-Jiménez D, Blanco JE, et al. Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006–2017). Int J Antimicrob Agents. 2018;52(1):104–8.
13. Miguela-Villoldo P, Moreno MA, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Borge C, et al. Complementarity of selective culture and qPCR for colistin resistance screening in fresh and frozen pig cecum samples. Front Microbiol. 2020;11:2793.
14. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J. Agents of last resort: polymyxin resistance. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):391–414.
15. OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. World Organisation for animal health. 2019. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_July2019.pdf.
16. Categorisation of antibiotics in the European Union. EMA/CVMP/CHMP/682198/2017: European Medicines Agency (EMA). 2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf.
17. World Health Organization. The 2019 WHO AWaRe classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use. World Health Organization; 2019. Contract No.: WHO/EMP/IAU/2019.11.
18. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, et al. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? Int J Antimicrob Agents. 2013;42(5):379–83.
19. España reduce un 7,2% el consumo de antibióticos en salud humana y un 32,4% las ventas de antibióticos veterinarios Spanish Medicines and Health Care Products Agency (AEMPS); 12 de julio de 2019 [cited 2021]. https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/laAEMPS/2019/docs/NI-AEMPS-12-2019-consumo-total-antibioticos.pdf?x63731.

20. Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, et al. Changes in colistin resistance and mcr-1 abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. Lancet Infect Dis. 2020;20(10):1161–71.
21. European Medicines Agency. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. EMA/231573/2016 2016 [updated July 27, 2016]. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en-0.pdf.
22. Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA, JIACRA III. 2016–2018. ECDC, EFSA, EMA: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA). 2021. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/third-joint-interagency-antimicrobial-consumption-and-resistance-analysis-report#no-link.
23. Miguela-Villoldo P, Hernández M, Moreno MA, Rodríguez-Lázaro D, Quesada A, Domínguez L, et al. National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. Res Vet Sci. 2019;123:141–3.
24. Eropean Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. Trends from 2010 to 2020. Eleventh ESVAC report. 2021. EMA/58183/2021. Veterinary Medicines Division. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-2020-trends-2010-2020-eleventh_en.pdf#page=97&zoom=100,0,0.
25. Yacouba A, Olowo-Okere A. Global trends and current status in colistin resistance research: a bibliometric analysis (1973–2019). F1000Research. 2020;9:856.
26. Gagliotti C, Bolzoni L, Carretto E, Sarti M, Ricchizzi E, Ambretti S, et al. Reduction trend of mcr-1 circulation in Emilia-Romagna Region, Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021;40:2585–92.
27. Makita K, Fujimoto Y, Sugahara N, Miyama T, Usui M, Asai T, et al. Quantitative release assessment of mcr-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* from Japanese pigs. Food Saf. 2020;8(2):13–33.
28. Gao Y, Lu C, Shen D, Liu J, Ma Z, Yang B, et al. Elimination of the risks of colistin resistance gene (mcr-1) in livestock manure during composting. Environ Int. 2019;126:61–8.
29. Chen X, Zhao X, Che J, Xiong Y, Xu Y, Zhang L, et al. Detection and dissemination of the colistin resistance gene, mcr-1, from isolates and faecal samples in China. J Med Microbiol. 2017;66(2):119–25.
30. Terveer EM, Nijhuis RHT, Crobach MJT, Knetsch CW, Veldkamp KE, Gooskens J, et al. Prevalence of colistin resistance gene (mcr-1) containing Enterobacteriaceae in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a mcr-1 containing, colistin susceptible *E. coli*. PLoS ONE. 2017;12(6):e0178598.
31. European Medicines Agency. Spain trends sales antimicrobial VMPs food producing animals between 2010–2020. 2021. EMA/510455/2021. Veterinary Medicines Division. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/spain-trends-sales-antimicrobial-vmps-food-producing-animals-between-2010-2020_en.pdf.
32. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. 2018. https://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0.
33. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC). Interactive ESVAC database: European Medicines Agency (EMA). https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac#interactive-esvac-database-section.
34. Publicly available assessment report for a veterinary medicinal product: Oxido de Zinc Calier. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS): ES/V0138/001/MR. https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ipe/1599+ESP/IPE_1599+ESP.pdf.
35. Commission Regulation (EC) No 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. Off J Eur Union L187. 2003;46:0011–5.
36. Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen B-A, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, et al. Prevalence of mcr-1 in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. PLoS ONE. 2016;11(7):e0159863-e.
37. Sun J, Zeng X, Li X-P, Liao X-P, Liu Y-H, Lin J. Plasmid-mediated colistin resistance in animals: current status and future directions. Anim Health Res Rev. 2017;18(2):136–52.
38. Authority EFS, Prevention ECfD, Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. EFSA J. 2019;17(2):e05598.
39. European Medicines Agency. Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species. EMA/394961/2017 2017 [updated 26 June 2017]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/zinc-oxide-article-35-referral-questions-answers-veterinary-medicinal-products-containing-zinc-oxide_en.pdf.
40. Wang Z, Fu Y, Schwarz S, Yin W, Walsh TR, Zhou Y, et al. Genetic environment of colistin resistance genes mcr-1 and mcr-3 in *Escherichia coli* from one pig farm in China. Vet Microbiol. 2019;230:56–61.
41. Migura-Garcia L, Gonzalez-Lopez JJ, Martinez-Urtaza J, Aguirre Sanchez JR, Moreno-Mingorance A, Perezde Rozas A, et al. mcr-colistin resistance genes mobilized by Inc X4, IncHI2, and IncI2 plasmids in *Escherichia coli* of pigs and white stork in Spain. Front Microbiol. 2019;10:3072.
42. Yang QE, MacLean C, Papkou A, Pritchard M, Powell L, Thomas D, et al. Compensatory mutations modulate the competitiveness and dynamics of plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* clones. ISME J. 2020;14(3):861–5.
43. Nang SC, Morris FC, McDonald MJ, Han ML, Wang J, Strugnell RA, et al. Fitness cost of mcr-1-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2018;73(6):1604–10.
44. Yang Y-Q, Zhang A-Y, Ma S-Z, Kong L-H, Li Y-X, Liu J-X, et al. Co-occurrence of mcr-1 and ESBL on a single plasmid in *Salmonella enterica*. J Antimicrob Chemother. 2016;71(8):2336–8.
45. Shafiq M, Huang J, Shah JM, Ali I, Rahman SU, Wang L. Characterization and resistant determinants linked to mobile elements of ESBL-producing and mcr-1-positive *Escherichia coli* recovered from the chicken origin. Microb Pathog. 2021;150:104722.
46. Trujillo-Soto T, Machuca J, Arca-Suárez J, Rodríguez-Iglesias M, Galán-Sánchez F. Co-occurrence of mcr-1 and qnrS1 on an IncHI2 plasmid in clinical isolates of Salmonella typhimurium in Spain. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2019;19(9):662–5.
47. Chiou C-S, Chen Y-T, Wang Y-W, Liu Y-Y, Kuo H-C, Tu Y-H, et al. Dissemination of *mcr-1*-carrying plasmids among colistin-resistant Salmonella strains from humans and food-producing animals in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(7):e00338-e417.
48. Sun J, Li XP, Fang LX, Sun RY, He YZ, Lin J, et al. Co-occurrence of mcr-1 in the chromosome and on an IncHI2 plasmid: persistence of colistin resistance in *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents. 2018;51(6):842–7.
49. Li J, Shi X, Yin W, Wang Y, Shen Z, Ding S, et al. A multiplex SYBR green real-time PCR Assay for the detection of three colistin resistance genes from cultured bacteria, feces, and environment samples. Front Microbiol. 2017;8:2078.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

II. Participación en otros trabajos relacionados con la tesis

1. Gallardo A, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez L, Quesada A: Involvement of *hpap2* and *dgkA* Genes in Colistin Resistance Mediated by *mcr* Determinants. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(9).

2. Gallardo A, Iglesias M-R, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Gutiérrez G, Rodríguez-Lázaro D, Domínguez L, Quesada A: The Plasmid-Mediated *Kluyvera*-Like *arnBCADTEF* Operon Confers Colistin (Hetero)Resistance to *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(5):e00091-00021.

III. Publicaciones en congresos nacionales e internacionales

1. Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M, Iglesias MR, Gallardo A, Quijada NM, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A. Nuevos determinantes de la resistencia a la colistina en Escherichia coli de origen animal. XXII Congreso SEIMC 2018. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2018. España. Comunicación oral.

2. Miguela-Villoldo P, Maasoumi-Nouha N, Hernandez M, Moreno MA, Rodríguez-Lázaro D, García M, Quesada A, Rivero E, Domínguez L, Ugarte-Ruiz M. Use of quantitative real-time PCR for testing trends of the *mcr-1* colistin-resistance gene in Spanish pig caecal contents. The One Health EJP Annual Scientific Meeting 2019. European Joint Programme One Health EJP. 2019. Irlanda. Póster y comunicación oral.

3. Rebollada-Merino A, Ugarte-Ruiz M, Miguela-Villoldo P, Fernández-Manzano A, García N, Gómez S, Bárcena C, de Juan L, Domínguez L, Rodríguez-Bertos A. Fermented defatted alperujo (FDA) reduces histopathological lesions and *Brachyspira* spp. excretion in naturally infected laying hens. The One Health EJP Annual Scientific Meeting 2020. European Joint Programme One Health EJP. 2020. República Checa. Póster.

4. Miguela-Villoldo P, Rebollada-Merino A, Rodriguez-Bertos A, Moreno MA, Dominguez L, Ugarte-Ruiz M. Effect of colistin on the selection of *mcr-1* in bacteria in broiler chicken gut. The One Health EJP Annual Scientific Meeting 2020. European Joint Programme One Health EJP. 2020. República Checa. Comunicación oral.

5. Miguela-Villoldo P, Moreno MA, Agüero M, Saez JL, Dominguez L, Ugarte-Ruiz M. Evaluation of the effect of colistin reduction in pigs on *mcr-1* detection. The One Health EJP Annual Scientific Meeting 2021. European Joint Programme One Health EJP. 2021. Dinamarca. Comunicación oral.

IV. Participación en otros trabajos

1. Rebollada-Merino A, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Abad D, Cuesta-Álvaro P, Rodríguez-Lázaro D, de Juan L, Domínguez L, Rodríguez-Bertos A: Dietary supplementation with fermented defatted "alperujo" induces modifications of the intestinal mucosa and cecal microbiota of broiler chickens. *Poult Sci.* 2020;99(11):5308-5315.

2. Rebollada-Merino A, Ugarte-Ruiz M, Hernández M, Miguela-Villoldo P, Abad D, Rodríguez-Lázaro D, de Juan L, Domínguez L, Rodríguez-Bertos A: Reduction of *Salmonella* Typhimurium Cecal Colonisation and Improvement of Intestinal Health in Broilers Supplemented with Fermented Defatted 'Alperujo', an Olive Oil By-Product. *Animals*. 2020;10(10).

3. Fernández-Garayzábal JF, Miguela-Villoldo P, Vela AI. Moraxella. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* 2022. p. 1-28.

4. Fernández-Garayzábal JF, Miguela-Villoldo P, Vela AI. Moraxellaceae. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2022. p. 1-9.