

# RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN LISTERIA MONOCYTOGENES Y SALMONELLA ENTERICA AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

## ANTIBIOTIC RESISTANCES IN LISTERIA MONOCYTOGENES AND SALMONELLA ENTERICA ISOLATED FROM FOODS WITH ANIMAL ORIGIN

Baltasar Balsalobre Hernández, Joaquín Hernández-Godoy

Centro de Salud Pública de Utiel. c/ Escuelas Pías s/n 46300-Utiel (Valencia)

### RESUMEN

El uso extensivo de antibióticos para la salud humana y animal así como para mejorar la producción ganadera ha generado un gran número de cepas microbianas resistentes a antibióticos de uso común. Es bien conocida la difusión de resistencias a través de la terapéutica humana y animal, pero desconocemos en qué medida los alimentos de origen animal destinados a consumo humano son portadores de resistencias.

En este trabajo, se investigó la sensibilidad a diecinueve antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* aisladas de diferentes alimentos de origen animal, como son carnes frescas, hamburguesas, salchichas y chorizos frescos, jamón cocido y huevos frescos, utilizando la técnica de difusión en placa.

Las cepas de *L. monocytogenes* fueron muy sensibles a todos los antibióticos utilizados, con la única excepción de una cepa resistente a la tetraciclina. En cambio, en *S. enterica* la presencia de resistencias es muy frecuente siendo común la multi-resistencia. La mayor frecuencia de resistencias fue frente a tetraciclina, estreptomycin, ácido nalidíxico, ticarcilina, ampicilina y cloramfenicol. El veinte por ciento de las cepas mostraron resistencia a 4 o más antibióticos. Por serotipos, el mayor número de resistencias se dio en las salmonellas de serotipo 4,5,12:i-, Hadar, Typhimurium y Virchow.

Se concluye que *Salmonella enterica* aislada de alimentos de origen animal destinados a consumo humano es un microorganismo portador de frecuentes resistencias. El significado de esta observación y su potencial riesgo para la salud debe ser investigado. En el caso de *L. monocytogenes*, la presencia de resistencia no es significativa.

**PALABRAS CLAVE:** resistencias, antibióticos, alimentos.

### ABSTRACT

Extensive use of antibiotics in both human and animal health and in cattle production has generated resistant microorganisms to common antibiotics. Resistances spread caused by human and animal therapeutic is well known, but we know poorly frequency of resistant bacteria in foods with animal origin and destined to human consumers. In this paper, sensitivity to nineteen antibiotics was investigated in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains isolated from foods with animal origin, including fresh meat, hamburgers, fresh sausages, boiled ham and new-laid chicken eggs. The plate diffusion method of Bauer-Kirby was used.

*Listeria monocytogenes* strains showed a very high sensitivity to all antibiotics checked, with the exception of one strain tetracycline resistant. In contrast, *Salmonella enterica* showed a high frequency of resistances, in special to tetracycline, streptomycin, nalidixic acid, ticarcillin, ampicillin and chloramphenicol. Moreover, multi-resistance was a common phenomenon. Twenty percent of *S. enterica* strains were resistant to four or more antibiotics. Frequency of resistances was higher in 4,5,12:i-, Hadar, Typhimurium and Virchow serotypes.

In conclusion, *Salmonella enterica* strains isolated from foods with animal origin and destined to human consumers are usually resistant to several antibiotics. The significance of this observation and its potential health risk must be investigated.

**KEY WORDS:** resistances, antibiotics, foods.

## INTRODUCCIÓN

El uso creciente de antibióticos para la salud humana y animal, así como para la producción ganadera, ha sido acompañando del desarrollo de mecanismos de evasión por parte de microorganismos anteriormente sensibles. De este modo, desde los años 50 hasta la actualidad no han cesado de crecer las descripciones de microorganismos que han adquirido alguna forma de resistencia contra uno o más antibióticos. Inicialmente se monitorizó la evolución de las resistencias a antimicrobianos en los aislamientos originados en la clínica humana y posteriormente se dio gran importancia a la necesidad de la monitorización en los aislamientos de origen animal<sup>1-3</sup>.

Se ha prestado escasa atención a la presencia de gérmenes resistentes en los alimentos destinados a consumo humano, especialmente en los de origen animal y que presumiblemente pueden ser portadores de resistencias. Muchos de los microorganismos ingeridos con los alimentos pueden ocasionar enfermedades con carácter oportunista si se dan las circunstancias apropiadas. Así, *Salmonella enterica* es una de las causas más importantes de toxiinfección alimentaria y *Listeria monocytogenes* puede ocasionar la listeriosis, además de otras enfermedades menos frecuentes.

El hecho de que ambas bacterias pudieran ser portadores frecuentes de resistencias a antibióticos podría tener importantes implicaciones para la salud humana y animal. Por una parte podría dificultar la terapia antibiótica en aquellos casos en que pudiera ser necesaria, pero además podrían contribuir de forma importante a la difusión de resistencias dada la capacidad de ambos gérmenes para intercambiar material genético con otros gérmenes habituales del intestino humano y animal.

Este trabajo pretende determinar la frecuencia de resistencias a antibióticos de uso común en microorganismos potencialmente patógenos que se aíslan con cierta frecuencia de alimentos de origen animal de nuestro medio, tomando como indicadores a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se investiga la sensibilidad a antibióticos de 30 aislamientos de *Listeria monocytogenes* y 35 de *Salmonella enterica* obtenidos a partir de alimentos de origen animal destinados a consumo humano, y que fueron tomados entre los años 1998 y 2003 dentro del Programa de Vigilancia Sanitaria de Alimentos, de la Dirección General de Salud Pública (Generalitat Valenciana) en las áreas de salud 06, 07 y 08, pertenecientes a la provincia de Valencia. Todas las cepas de *Listeria* y 28 cepas de *Salmonella* se aislaron de carnes frescas y productos cárnicos (salchichas frescas, chorizos frescos, hamburguesas, albóndigas, jamón cocido). Las siete cepas de *Salmonella* restantes se aislaron de huevos frescos.

Para el estudio se ensayaron 19 antibióticos (BioMèrieux) de uso frecuente mediante la técnica de difusión de Kirby-Bauer<sup>4</sup>; los antibióticos y las concentraciones ensayadas fueron: ácido nalidíxico (NA) 30 µg, amikacina (AN) 30 µg, amoxicilina-clavulánico (AMC) 30 µg, ampicilina (AM) 10 µg, cefalotina (CF) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, cloramfenicol (C) 30 µg, colistina (CL) 50 µg, eritromicina (E) 15 µg, estreptomina (S) 10 µg, gentamicina (GM) 10 µg, kanamicina (K) 30 µg, nitrofurantoína (FM) 300 µg, penicilina G (P) 10 µg, tetraciclina (TE) 30 µg, ticarcilina (TIC) 75 µg, tobramicina (NN) 10 µg, trimetropina-sulfometoxazol (SXT) 1.25+23.75 µg y vancomicina (VA) 30 µg.

No todos los antibióticos se ensayaron con ambos microorganismos; así, colistina y ácido nalidíxico solo se ensayaron en *Salmonella* ya que el género *Listeria* es poco o nada sensible a ellos, mientras que penicilina G, eritromicina y vancomicina solo se ensayaron en *Listeria* y no en *Salmonella* al ser poco eficaces en gram negativos.

Los diámetros en mm obtenidos en los ensayos se compararon con los valores de referencia reconocidos por la NCCLS<sup>5-6</sup>. En el control de calidad se utilizó la cepa de *Escherichia coli* CECT 434, equivalente a la ATCC 25922. El serotipo de las cepas de *Salmonella* fue determinado en el Laboratorio de Enterobacteriáceas, del Instituto de Salud Carlos III.

## RESULTADOS

Las resistencias detectadas se recogen en la Tabla 1. Las cepas de *Listeria monocytogenes* resultaron muy sensibles a todos los antibióticos considerados; excepcionalmente, una cepa fue resistente a la tetraciclina.

Tabla 1.- Número y porcentaje de cepas resistentes por antibiótico

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Ácido nalidíxico 30 µg	—	13 (37.1 %)
Amikacina 30 µg	0	0
Amoxicilina-clavulánico 30 µg	0	0
Ampicilina 10 µg	0	10 (28.6 %)
Cefalotina 30 µg	0	1 (2.8 %)
Ciprofloxacina 5 µg	0	0
Cloramfenicol 30 µg	0	6 (17.1 %)
Colistina 50 µg	—	0
Eritromicina 15 µg	0	—
Estreptomina 10 µg	0	13 (37.1 %)
Gentamicina 10 µg	0	1 (2.8 %)
Kanamicina 30 µg	0	0
Nitrofurantoína 300 µg	0	2 (5.7 %)
Penicilina G 10 µg	0	—

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Tetraciclina 30 µg	1 (3.3 %)	20 (57.1 %)
Ticarcilina 75 µg	0	11 (31.4 %)
Tobramicina 10 µg	0	1 (2.8 %)
Trimetropina-sulfometoxazol 1.25+23.75 µg	0	2 (5.7 %)
Vancomicina 30 µg	0	

Por el contrario, *Salmonella enterica* presentó un amplio abanico de resistencias. Según se desprende de la tabla 1, las resistencias más frecuentes fueron, por este orden: tetraciclina, estreptomina, ácido nalidíxico, ticarcilina, ampicilina, y cloramfenicol, siendo las restantes menos frecuentes. La Tabla 2 muestra el perfil de resistencias de los aislamientos de *Salmonella*, así como el serotipo y el alimento de origen. Solo cuatro de los aisla-

mientos de *Salmonella* (el 11.3 % de las cepas) fueron sensibles a todos los antibióticos considerados en este estudio, y trece aislamientos presentaron una única resistencia (37.1%). Los 18 aislamientos restantes (51.4%) fueron resistentes a dos o más antibióticos, y 7 de ellos (20 %) a 4 o más antibióticos, pudiendo detectarse hasta ocho resistencias simultáneas.

**Tabla 2.- Características de las cepas de *Salmonella* estudiadas. Se expresa serotipo, alimento de origen y perfil de resistencias.**

Cepa	Serotipo	Alimento	Perfil de resistencias
1	Typhimurium	Pollo fresco	Te
2	Anatum	Cerdo fresco	—
3	4,5,12:i-	Cerdo fresco	C-S-Te
4	Typhimurium	Longaniza fresca	—
5	Typhimurium	Cerdo fresco	C-S-Te
6	Typhimurium	Chorizo fresco	Am-C-S-Te-Tic
7	Typhimurium	Cerdo fresco	Am-C-S-Te-Tic
8	Infantis	Huevo fresco	S
9	Hadar	Pollo fresco	S-Na-Te
10	Bredeney	Cerdo fresco	—
11	4,5,12:i-	Longaniza fresca	Am-S-Te-Tic
12	Hadar	Pollo fresco	S-Na-Te
13	Typhimurium	Pollo fresco	S-Na-Fm
14	Enteritidis	Huevo fresco	Na
15	4,5,12:i-	Albóndigas de cerdo	Am-C-S-Gm-Te-Tic-Nn-Stx
16	Newport	Salchicha fresca	Te
17	Hadar	Pollo fresco	Am-Cf-S-Na-Te-Tic
18	Virchow	Salchicha fresca	Am-S-Te-Tic
19	Enteritidis	Huevo fresco	Na
20	Enteritidis	Pollo fresco	Na
21	Anatum	Hamburguesa de pollo	Na
22	Kottbus	Pollo fresco	Na
23	Typhimurium	Chorizo fresco	Te
24	Typhimurium	Hamburguesa de cerdo	Am-C-Fm-Te-Tic
25	Enteritidis	Huevo fresco	Na
26	Hadar	Hamburguesa de cerdo	S-Na-Te
27	Braenderup	Huevo fresco	Am-K-Tic
28	Enteritidis	Huevo fresco	—
29	Anatum	Cerdo fresco	Te-Tic-Sxt
30	Enteritidis	Huevo fresco	Am-Tic
31	Derby	Albóndigas de cerdo	Na-Te
32	Rissen	Jamón cocido	Te
33	Rissen	Pollo fresco	Te
34	Typhimurium	Cerdo fresco	Am-Te-Tic
35	Enteritidis	Salchicha fresca	Na

No se pudo encontrar ninguna asociación entre los tipos de resistencias y los serotipos. Los serotipos que presentan un número más elevado de resistencias son 4,5,12:i- y Hadar, seguidos de Typhimurium y Virchow.

Tampoco existen asociaciones claras entre tipo de resistencia y tipo de alimentos, aunque la resistencia al ácido nalidíxico resulta mucho más frecuente en los productos relacionados con las aves. Así, de las trece cepas resistentes a este antibiótico, diez se aislaron en carne fresca de pollo, hamburguesa de pollo o huevos frescos.

## DISCUSIÓN

Los perfiles de resistencias observados difieren mucho entre los dos microorganismos. Así, *Listeria monocytogenes* aparece como un microorganismo muy sensible a los antibióticos considerados y en el que la resistencia a antibióticos es un fenómeno aislado y ocasional. En cambio, en *Salmonella enterica* la resistencia a antibióticos es un fenómeno muy frecuente, siendo la multi-resistencia un hecho habitual.

En las cepas de *L.monocytogenes* de este estudio, la baja frecuencia de resistencias y la aparición de un caso aislado de resistencia a la tetraciclina, son hallazgos similares a los obtenidos por otros investigadores en otros países <sup>7</sup> y no constituye un riesgo para la salud pública en el aspecto estudiado. No obstante, algunos investigadores han sugerido que esta situación podría cambiar con el tiempo debido a que otras especies de *Listeria* como *L.innocua*, que con mucha frecuencia está presente en carnes y productos cárnicos, presentan ya frecuentes resistencias pudiendo existir transferencia de información genética de una especie a otra a través de diversos mecanismos, transferencia que se han demostrado *in vitro* para la estreptomina, eritromicina y cloramfenicol <sup>8,9</sup>. También hay que añadir que *Listeria* puede adquirir resistencias a partir de otros géneros bacterianos con los que está poco emparentados, como *Enterococcus* y *Streptococcus*, y que son frecuentes portadores de resistencias, sobre todo a la tetraciclina <sup>10-14</sup>.

Más compleja es la situación en *Salmonella*. De los resultados se desprende que este microorganismo es un portador habitual de resistencias y pocas veces carece de ellas. La resistencia a algunos antibióticos de amplio espectro aparece en nuestro estudio con porcentajes mayores que los descritos con anterioridad en alimentos en nuestro país, principalmente respecto a la estreptomina, ampicilina y tetraciclina <sup>15</sup>.

La distribución de resistencias puede tener importantes diferencias geográficas dependiendo probablemente de los hábitos locales en el uso de antibióticos. Así, el análisis de las salmonelas aisladas de carne de pollo en otros países mediterráneos reveló que la resistencia más frecuente se dio frente a la nitrofurantoína, resistencia muy poco frecuente en nuestro estudio, y a continuación frente a ampicilina y ticarcilina; por el contrario, las resistencias frente a estreptomina, tetraciclina y ácido nalidíxico fueron muy poco frecuentes <sup>16</sup>.

Uno de los problemas que podría derivarse de la carga de resistencias es la posibilidad de que dificulten un tratamiento en caso de que sea necesario. La salmonelosis generalmente no requiere tratamiento antibiótico, pero cuando éste es necesario se han utilizado antimicrobianos tales como ampicilina, cloramfenicol y trimetropina-sulfometoxazol. Nuestro estudio revela frecuentes

resistencias, especialmente en el caso de la ampicilina, resistencia que está presente en la tercera parte de las cepas de *Salmonella*.

En relación con la resistencia a trimetropina-sulfometoxazol es de destacar que, en nuestro país, el aislamiento de cepas portadoras de esta resistencia en muestras no clínicas fue asociado hace años a cepas de *Salmonella* obtenidas de aguas contaminadas pero no se pudo observar en muestras de alimentos <sup>15</sup>. En nuestro caso la situación es diferente y aunque la frecuencia es baja, puede detectarse esta resistencia en dos cepas aisladas de productos preparados a partir de carne picada de cerdo (albóndigas y hamburguesa); en ambos casos se trató de cepas portadoras de un número muy elevado de resistencias.

Los resultados difieren entre sí en las dos quinolonas consideradas en el estudio: ciprofloxacina y ácido nalidíxico. La elevada frecuencia con que se detectan resistencias a éste último en los alimentos derivados del pollo sugiere una posible relación con la alta medicación a que se somete a estas aves, circunstancia no suficientemente investigada. En cambio, no se observan resistencias frente a la ciprofloxacina, una fluoroquinolona cuyo uso no está autorizado para uso animal en Europa. El uso generalizado de la enrofloxacin, antibiótico autorizado para uso animal con estructura y funcionalidad similar a la ciprofloxacina, lleva a algunos autores a advertir que en el futuro podrán aparecer resistencias a la ciprofloxacina ya que, se ha demostrado, es capaz de inducir esta resistencia en algunas bacterias <sup>17</sup>.

La importancia del uso animal de las quinolonas en el desarrollo de resistencias por diversos microorganismos, incluyendo *Campylobacter* y *Salmonella*, ha sido reconocida en un informe de la Organización Mundial de la Salud <sup>18</sup>. El mismo informe revela la tendencia a la resistencia cruzada entre las quinolonas, lo que facilitaría la aparición de nuevas resistencias.

Por serotipos, *S.typhimurium* es el que más se cita como el serotipo patógeno que frecuentemente presenta resistencia a múltiples fármacos <sup>19</sup>, hecho que se observa tanto en Europa <sup>20</sup> como en América <sup>21-22</sup>. Como muestra el presente estudio, *S.typhimurium* es frecuente portadora de multi-resistencia en nuestro entorno, pero otros serotipos también patógenos presentaron un mayor grado de resistencia a fármacos, destacando 4,5,12:i- y *S.hadar*. Por el contrario, el serotipo *Enteritidis*, que es el que con más frecuencia ocasiona brotes de toxiinfección alimentaria, resultó muy sensible a casi todos los antibióticos excepto al ácido nalidíxico y, en un único caso, a la ampicilina y la ticarcilina.

No se conoce con certeza la cantidad de antibiótico utilizado en ganadería y agricultura, aunque se supone que en algunos países podría alcanzar hasta el 50% de antibióticos consumidos en el país <sup>23</sup>. Estos antibióticos se utilizan con fines terapéuticos y profilácticos, pero también complementando a los piensos como promotores del crecimiento en todo tipo de animales; esta última circunstancia puede ser de gran importancia en la generación de resistencias ya que se utilizan en dosis subterapéuticas.

La Organización Mundial de la Salud recomienda una mayor formación y educación para ganaderos y veterinarios para contrarrestar la generación de resistencias así como un endurecimiento de la legislación al respecto. También recomienda que el uso de antibióticos como promotores del crecimiento solo se autorice si no se usan

en terapéutica humana ni pueden dar reacción cruzada con los que sí se utilizan.

Otra posible consecuencia de la elevada frecuencia de resistencias en *Salmonella* es la propagación a otros gérmenes patógenos u oportunistas presentes en alimentos o en el intestino humano. Aunque esta transferencia de resistencias ocurre muy fácilmente *in vitro*, no está claro en qué medida ocurre *in vivo* existiendo escasas evidencias que han sido obtenidas en otras enterobacterias<sup>24</sup>.

En resumen, el estudio concluye que *Salmonella entérica* aislada de alimentos de origen animal destinados al consumo humano es habitualmente portadora de resistencias a antibióticos. Las controversias existentes en este tema y la posibilidad de que en el futuro este hecho pudiera constituir un problema de salud pública apoyan la necesidad de profundizar en su estudio.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Caprioli A, Busani L, Martel JL, Helmuth R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 295-301.
- 2.-Wray C, Gnanou JC. Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 291-294.
- 3.-Moreno MA, Domínguez L, Teshager T, Herrero IA, Concepción M. Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 285-290.
- 4.-Bauer AW, Kirby WMW, Sherris JC and Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493-496.
- 5.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial disk and dilution tests for bacteria isolated from animals; approved standard. NCCLS document M 31-A 1999; 19(11).
- 6.-National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. NCCLS document M 100-S9 1999; 19(1).
- 7.-Walsh D, Duffy G, Sheridan JJ, Blair IS and McDowell DA. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *J Appl Microbiol* 2001; 90:517-522.
- 8.-Vicente MF, Baquero F and Peres-Díaz JC. Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in *Listeria* spp. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21:309-318.
- 9.-Roberts MC, Facinelli B, Giovanetti E and Varaldo PE. Transferable erythromycin resistance in *Listeria* spp. isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:269-270.
- 10.-Poyart-Salmeron C, Trieu-Cuot P, Carlier C, MacGowan A, McLaughlin J and Courvalin P. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 35:463-466.
- 11.-Speer BS, Shoemaker NB and Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:387-399.
- 12.-Charpentier E, Gerbaud G and Courvalin P. Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2330-2335.
- 13.-Charpentier E and Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(9):2103-2108.
- 14.-Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cuot P, Courtieu AL and Courvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet* 1990; 335:1422-1426.
- 15.-Luque A, Moriñigo MA, Rodríguez-Avial C, Picazo JJ and Borrero JJ. Resistencias a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes orígenes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12:187-192.
- 16.-Arvanitidou M, Tsakris A, Sofianou D and Katsouyannopoulos V. Antimicrobial resistance and R - factor transfer of salmonellae from chicken in Greek hospitals. *Int J Food Microbiol* 1998; 40:197-201.
- 17.-Jacobs-Reitsma WF, Kan CA, Bolder NM. The induction of quinolone resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. *Lett Appl Microb* 1994; 19(4):228-231.
- 18.-World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report WHO/EMC/ZDI/98.10
- 19.-Rabsch W, Tschäpe H and Bäumlner AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infection* 2001; 237-247.
- 20.-Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR, Rowe B. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella typhimurium* DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet Rec* 1994;134:577
- 21.-Cohen ML, Tauxe RV. Drug-resistant *Salmonella* in the United States: an epidemiologic perspective. *Science* 1986; 234: 964-969.
- 22.-Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* 1998; 338: 1333-1338.
- 23.-World Health Organization. The medical impact of antimicrobial use in food animals. WHO/EMC/ZOO/97.4
- 24.-Levy SB, Fitzgerald GB, Macone AB. Spread of antibiotic resistance plasmids from chicken to chicken and chicken to man. *Nature* 1976; 260:40-42.