

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Impacto de administración de una cefalosporina de tercera generación
en la población de *E.coli* intestinal de pollos de engorde.**

Melany Nicole Jumbo Zamora

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 17 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Impacto de administración de una cefalosporina de tercera generación en la población de *E.coli* intestinal de pollos de engorde.

Melany Nicole Jumbo Zamora

Nombre del profesor, Título académico

Gabriel Trueba, PhD

Quito, 17 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Melany Nicole Jumbo

Zamora Código: 00321572

Cédula de identidad: 1750879874

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La crisis de resistencia a los antibióticos es un problema creciente que afecta a la salud pública global y la industria avícola juega un rol importante en este contexto, puesto que el uso de antibióticos en animales puede contribuir a la resistencia bacteriana en humanos. En relación a esto, los pollos de engorde, dependen de una dieta balanceada para su crecimiento y buena salud. Dentro de esta dieta se incluye vitaminas, minerales, aminoácidos, además de promotores de crecimiento, anti fúngicos y antibióticos. La exposición a diversos patógenos durante la vida del pollo, puede afectar su producción, es por esto que se usan antibióticos para combatir enfermedades víricas, micóticas y bacterianas. El uso de cefalosporinas de tercera generación, se ha establecido como una estrategia para tratar infecciones graves bacterianas por cepas que producen β -lactamasas en humanos. Por ello, este estudio tiene como objetivo determinar la frecuencia de resistencia a la ceftriaxona en las bacterias intestinales de estos pollos y evaluar como las vías de administración de ceftriaxona, oral y parenteral, afectan la prevalencia de *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de 3^{ra} generación. Se llevó a cabo ensayos en 21 pollos divididos en tres grupos de tratamiento con ceftriaxona: uno por vía oral (G1), otro por vía parenteral (G2) y un grupo control sin antibióticos (G3). Tras la administración del antibiótico, se observó un aumento en la prevalencia de cepas *E.coli* resistente a ceftriaxona (>50%) y se alcanzó hasta 100% en algunos casos. En los análisis estadísticos se mostró que no había diferencia significativa entre ambas vías de administración, lo que sugiere que ambas vías contribuyen a la presión selectiva que favorece la selección de resistencia bacteriana. Sorprendentemente, la presencia de cepas resistentes se elevó luego de dos semanas de haber suspendido el antibiótico. Estos hallazgos resaltan una necesidad urgente de revisar las prácticas actuales en la administración de antibióticos en los pollos.

Palabras clave: Ceftriaxona, *Escherichia coli*, resistencia bacteriana, antibióticos, vía oral y parenteral, pollos, presión selectiva, β -lactamasas .

ABSTRACT

The antibiotic crisis is a growing problem affecting global public health and the poultry industry plays an important role in this context, since the use of antibiotics in animals can contribute to bacterial resistance in humans. Broiler chickens depend on a balanced diet for their growth and good health. This diet includes vitamins, minerals, amino acids, as well as growth promoters, antifungals and antibiotics. Exposure to various pathogens can affect chicken production, which is why antibiotics are used to prevent bacterial diseases. The use of third generation cephalosporin has been established as a strategy to treat bacterial infections caused by strains that produce β -lactamases in humans. Therefore, this study aims to determine the frequency of resistance to ceftriaxone in the intestinal bacteria of these chickens and to evaluate how the ceftriaxone administration routes, oral and parenteral, affect the prevalence of *Escherichia coli* resistant to 3rd generation cephalosporins. Trials were carried out in 21 chickens divided into three treatment groups with ceftriaxone: one by oral route (G1), another by parenteral route (G2) and a control group without antibiotics (G3). After administration of the antibiotic, an increase in the prevalence of *E. coli* strains resistant to ceftriaxone (>50%) was observed and reached up to 100% in some cases. Statistical analysis showed that there was no significant difference between both administration routes, suggesting that both routes contribute to the selective pressure that favors the selection of bacterial resistance. Surprisingly, the presence of ceftriaxone resistant *E. coli* increased after 2 weeks without antibiotics. These findings highlight an urgent need to review current practices in the administration of antibiotics in chicken.

Keywords: Ceftriaxone, *Escherichia coli*, bacterial resistance, antibiotics, oral and parenteral routes, chickens, selective pressure, β -lactamases.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	11
Métodos.....	13
Planificación del espacio de los pollos de engorde	13
Procesamiento de muestras	14
Procedimiento final de los pollos	15
Procesamiento de datos obtenidos	15
Resultados.....	16
Discusión	17
Conclusiones	19
Tablas	20
Figuras	21
Referencias bibliográficas	23
Anexos	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de resistencia de los tres grupos de pollos antes (T1), durante (T2) y después (T3) de la administración del antibiótico	20
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la frecuencia (eje Y) de los tres grupos de tratamiento (eje X): oral parenteral y control	21
Figura 2. Comparación prevalencia predicha en pollos de engorde, a lo largo del tiempo, bajo las vías de administración con ceftriaxona	22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Esquema de la fase experimental de alimentación y administración de antibióticos...25

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un tema de gran importancia para la salud pública mundial y el uso de antimicrobianos en la producción animal desempeña un rol fundamental en esta situación. La administración de antibióticos en la alimentación de pollos de engorde, es usado como un medio para prevenir distintas infecciones. Por otro lado, la ceftriaxona se emplea comúnmente en hospitales para el tratamiento de infecciones graves. (NIH, 2021; Vijay *et al.*, 2023).

Durante el crecimiento y desarrollo de los pollos, estos pueden estar expuestos a diversos patógenos que pueden afectar la producción, lo que conlleva a la utilización de antibióticos y otros fármacos (Vega, 2023). Sin embargo, esto trae consigo una preocupación sobre la resistencia bacteriana lo que representa un problema de salud pública que impacta tanto a la sociedad como a la economía. El uso inapropiado e incontrolado de antibióticos favorece a la propagación de cepas resistentes, las cuales pueden transmitirse a través de la cadena alimenticia y genera un riesgo en la población humana. Esto ocurre tanto por contacto directo con productos contaminados con cepas resistentes, tales como carne y huevos. Similarmente, la presencia de bacterias resistentes a antibióticos se encuentra en el estiércol animal que son usados como abonos orgánicos (Vega, 2023; Huygens *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2020).

El uso de cefalosporinas en la industria avícola se ha evidenciado como estrategia para tratar infecciones bacterianas causadas por cepas productoras de β -lactamasas (Toai *et al.*, 2024). La ceftriaxona, clasificada como una cefalosporina de 3^{ra} generación, se distingue por su amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo altamente efectiva contra una variedad de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos, tales como *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras. Su mecanismo de acción se basa

en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, provocando una lisis y la muerte celular (Toai *et al.*, 2024). Con respecto a las cefalosporinas, esta se clasifica como un β -lactámico proveniente del hongo *Cephalosporium acremonium* y se caracteriza por su capacidad de efecto bactericida (National Library of Medicine, 2021).

Este estudio tuvo como objetivo determinar la frecuencia de la resistencia a la ceftriaxona (cefalosporina de 3^{ra} generación) en las bacterias *E. coli* del intestino de pollos de engorde y el impacto de administración, oral y parenteral, de cefalosporinas de 3^{ra} generación en la composición del resistoma de las bacterias intestinales en pollos de engorde.

MÉTODOS

Planificación del espacio de los pollos de engorde

Se adecuó un área de contención metálica de 1.0x1.0x0.8 metros, para cada uno de los grupos de pollos. Estos espacios se los techó con zinc y con un piso de lona gruesa cubierto de aserrín. En su interior cada espacio tuvo recipientes de agua y comida suficientes para proporcionar una alimentación sin antibióticos *ad libitum*, que se cambió diariamente. Estas áreas de contención se las colocó en una terraza abierta en una propiedad privada en Calderón – Quito, con el objetivo de simular un entorno de crianza de traspatio.

Se compró en un proveedor oficial 21 pollos de engorde raza Ross, estos se los dividió aleatoriamente en tres grupos de siete pollos cada uno. De este modo se empleó el tratamiento para cada grupo de manera aleatoria.

Grupo 1.

7 pollos que recibieron Ceftriaxona (100mg/kg cada 24H) vía oral.

Grupo 2.

7 pollos que recibieron Ceftriaxona (100mg/kg cada 24H) vía parenteral-intramuscular.

Grupo 3.

7 pollos control, los cuales recibieron solo una solución placebo (el disolvente del antibiótico empleado en los otros dos grupos).

Cada tratamiento se lo realizó por 5 días y después se desarrolló la planificación presentada en el *Anexo 1* en 28 días, dividido en tres etapas.

Etapas 1.

Pre-condicionamiento en 7 días.

Recolección de muestras en el día 8.

Etapa 2.

Administración de antibióticos por 5 días, al grupo 1 (vía oral), al grupo 2 (vía parenteral) y al grupo 3 (control) no se administró antibiótico.

Recolección de muestra en el día 14.

Etapa 3.

Post antibiótico, posterior a la administración del antibiótico se sigue administrando alimentación *ad libitum* sin antibiótico.

Finalmente, al terminar cada una de las etapas se recolectó muestras de heces de cada uno de los pollos, para este proceso se colocó al pollo sobre plástico limpio y se esperó que excrete de manera espontánea. Se recogió las heces en un recipiente estéril y debidamente etiquetado. Las muestras se las almacenó en un cooler a 4°C y se las transportó al laboratorio para ser procesadas en un periodo máximo de 12H.

Procesamiento de muestras

Al llegar las muestras de heces al laboratorio se pesó cada una, registrando así el peso inicial para posteriores cálculos. Se realizó las diluciones seriadas con solución salina estéril al 0.9%, se continuó con las demás diluciones en proporción 1:10 de manera seriada (*Anexo 1*). A continuación, se sembró cada una de las diluciones por triplicado en cajas Petri con medio MKL y MKL+Cefriaxona (2 µg/ml). Se aplicó la técnica de extensión en placa, por lo cual, se colocó 0.1ml (100ul) de cada dilución en el medio de cultivo. Todas las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

Al día siguiente, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC/g) en ambos medios MKL y MKL+Cef. Se aisló cinco colonias bacterianas resistentes por muestra analizada, del grupo tratado por vía oral. Posteriormente, se almacenó las bacterias aisladas en viales de BHI suplementado con glicerol al 20%, para su posterior análisis.

Procedimiento final de los pollos

Se sacrificó a los pollos al finalizar la investigación, ya que se les administró antibiótico vía oral y parenteral por lo cual se asume un aumento de las *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación junto con otros posibles genes de resistencia a antibióticos, lo que puede ocasionar la dispersión de estos genes a la comunidad. Posterior a la eutanasia controlada y reglamentada, los cadáveres se los desechó como restos biológicos autoclavables para que se continúe con el manejo de desechos reglamentado por la instalación.

Procesamiento de datos obtenidos

Los datos que se obtuvo fueron procesados usando GraphPad Prism 10, lo que permitió realizar análisis estadísticos y gráficos más precisos. Para comparar las prevalencias de resistencia entre los diferentes grupos analizados, se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney

RESULTADOS

La aplicación de ceftriaxona por vía oral y parenteral produjo una elevación de la prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes al antibiótico mencionado. Como se observa en la Tabla 1 y Gráfico 1, la prevalencia de resistencia antes de la administración del antibiótico ya era elevada, (>50%) entre todos los pollos. Es por esto, que luego de la administración del antibiótico se evidenció que tanto en la vía oral como parenteral la prevalencia de resistencia superó el 70% y llegó al 100% en muchos pollos (ver Tabla 1). Además, en la etapa post antibiótico (T3) dicha prevalencia se mantiene y algunos pollos que antes no alcanzaban el 100%, en esta etapa lo obtuvieron (ver Tabla 1). Al comparar ambas vías de administración se observó que la vía oral produjo mayor prevalencia de cepas resistentes de *E. coli* en comparación con la vía parenteral (ver Tabla 1). Asimismo, en la Figura 2 que muestra el aumento de la resistencia a lo largo del tiempo, se puede evidenciar un incremento notable de la prevalencia de resistencia en el grupo oral, alcanzando niveles cercanos al 90%, sugiriendo un mayor impacto por medio de esta vía de administración. Sin embargo, los análisis estadísticos indicaron que no existe una diferencia significativa entre ambas vías (oral y parenteral) (ver Figura 1). Según la figura mencionada se empleó un intervalo de confianza del 95%, lo que permitió determinar que los límites del intervalo para T2 y T3 (antibiótico y post-antibiótico) se superponen en ambas vías de administración. De igual manera, en el análisis del grupo control no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de cepas resistentes, lo que sugiere que no aumentó la frecuencia de *E. coli* resistentes en el microbioma intestinal de los pollos. Esto reafirma los resultados de los grupos oral y parenteral son producto de la administración de los antibióticos; y no por algún otro factor no controlable. No obstante, se detectó una diferencia significativa en el T1 (pre-antibiótico) en ambas vías de administración, esto indica que los niveles iniciales de resistencia eran significativamente menores en comparación con los valores observados tras la intervención experimental.

DISCUSIÓN

Se observó una alta presencia de *E. coli* resistente a ceftriaxona (30-80%) en los animales antes del tratamiento con el antibiótico (ceftriaxona) lo que sugiere que las poblaciones de pollos de engorde que se venden en el Ecuador está siendo tratada con cefalosporinas de 3^{ra} generación. La administración de antibiótico produjo un aumento de 100%, en la proporción de *E. coli* resistente a ceftriaxona. Esto se da por la presión selectiva generada en el intestino de los pollos luego de la administración del antibiótico (por ambas vías). Entonces, la prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes, se da puesto que el antibiótico favorece la proliferación y supervivencia de las aquellas cepas bacterianas que poseen genes de resistencia tales como *bla*_{CTX-M}, (Oromí, 2000; Gonzales, 2019).

Además, en los dos grupos de tratamiento (oral y parenteral) la presencia de cepas resistentes a ceftriaxona aumentó luego de dos semanas de terminado el tratamiento. Esto indica que el impacto del tratamiento con Ceftriaxona sobre la presencia de cepas resistentes, se mantiene por al menos 2 semanas luego de la finalización del tratamiento. Este fenómeno puede ser el resultado de una disrupción de la microbiota intestinal (causada por el antibiótico) que deja mayor posibilidad de crecimiento a estas bacterias resistentes (Oromí, 2000). Alternativamente, los genes de resistencia pueden haberse transferido a otras cepas durante este tiempo. Otros estudios como el de Acharya (2011) realizado en Nepal, coincide que se encontró 1% de resistencia en cepas *E. coli* aisladas de aves de corral comercializadas. Igualmente, un estudio realizado en carne de pollo cruda en Qatar, demuestra que se encontró un 5,1% de cepas *E. coli* resistentes a ceftriaxona y otros antibióticos (Eltai *et al.*, 2020). Con respecto a búsquedas en Ecuador no se encontró mucha literatura a excepción de la investigación realizada por Amancha *et al.*, (2023) que reporta niveles elevados de resistencia a Eritromicina (76%) y Tetraciclina (90%) en *E.coli*. No se especifica sobre la ceftriaxona para esta bacteria.

Antes de aplicar el tratamiento, al evaluar las diferentes vías de administración del antibiótico

ceftriaxona, se observó que entre ambas vías no existe una diferencia significativa que indique una mayor prevalencia de cepas *E. coli* resistentes, entre los grupos tratados. Esto se respalda por los resultados del análisis estadístico, donde las comparaciones entre los grupos oral ($80.9 \pm 5.2\%$) y parenteral ($96.1 \pm 3.7\%$) arrojaron un valor $p = 0.067$, indicando que no hay diferencia significativa en la frecuencia de resistencia entre ambas vías. Las comparaciones estadísticas, mostradas en la Figura 1, se realizaron mediante pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) para analizar las medianas de los grupos, con un intervalo de confianza del 95%. En estas comparaciones donde sí se observa una diferencia significativa es en la vía oral ($96.6 \pm 2.1\%$) versus el grupo control ($24.0 \pm 4.8\%$), donde se obtuvo un $p < 0.0001$ (****) (Figura 1). Esto confirma que la administración de ceftriaxona promueve resistencia, o sea que los resultados son atribuibles a la administración del antibiótico y no a factores externos. Otra explicación a este resultado no esperado, es el mecanismo de absorción y distribución del fármaco en el organismo del pollo, por ambas vías. Aunque las concentraciones alcanzadas en ambos están por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC) $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, esto genera una presión selectiva considerable para el desarrollo de resistencia (Cavaliere, 2005; Levison & Levison, 2009).

CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio tienen importantes implicaciones clínicas para el uso de antibióticos en la avicultura, especialmente en relación con la creciente preocupación por la resistencia a antimicrobianos. La falta de diferencias significativas en la prevalencia de cepas resistentes de *E. coli* entre las vías de administración oral y parenteral de ceftriaxona sugiere que ambos métodos pueden contribuir a la presión selectiva que favorece el desarrollo de resistencia bacteriana y su dispersión. Esto resalta la necesidad urgente de revisar las prácticas actuales en la administración de antibióticos en la industria avícola, promoviendo un uso más racional y controlado para minimizar el impacto en la salud pública.

En cuanto a futuras investigaciones, sería beneficioso explorar tratamientos alternativos, como el uso de bacteriófagos, que podrían ofrecer enfoques no antibióticos para el control de infecciones en aves. Además, se recomienda realizar estudios longitudinales que evalúen el impacto de la administración de antibióticos en la producción de animales de consumo humano a largo plazo. Así como investigar los mecanismos específicos detrás de la resistencia antimicrobianos.

TABLAS

Tabla 1. Frecuencias de resistencia de los tres grupos de pollos antes (T1), durante (T2) y después (T3) de la administración de antibiótico. En la primera columna de la izquierda se evidencia los grupos de siete pollos, primero la vía de administración oral, luego la parenteral y finalmente el grupo control.

	Frecuencia de <i>E.coli</i> Resistentes (%)		
	Pre Antibiótico (T1)	Antibiótico (T2)	Post antibiótico (T3)
Oral	37,821	88,889	88,125
Oral	68,702	100,000	88,889
Oral	15,116	100,000	100,000
Oral	30,088	100,000	87,455
Oral	22,917	87,368	100,000
Oral	27,083	100,000	98,876
Oral	86,557	100,000	100,000
Parenteral	28,571	100,000	100,000
Parenteral	12,428	63,964	87,687
Parenteral	7,253	54,737	94,030
Parenteral	9,778	100,000	84,211
Parenteral	27,436	89,558	100,000
Parenteral	33,947	100,000	100,000
Parenteral	9,031	57,895	100,000
Control	11,515	1,911	51,471
Control	35,507	40,000	4,677
Control	60,714	73,529	20,225
Control	21,893	22,222	86,232
Control	15,385	8,609	9,706
Control	44,776	8,855	1,250
Control	47,895	13,158	1,176

FIGURAS

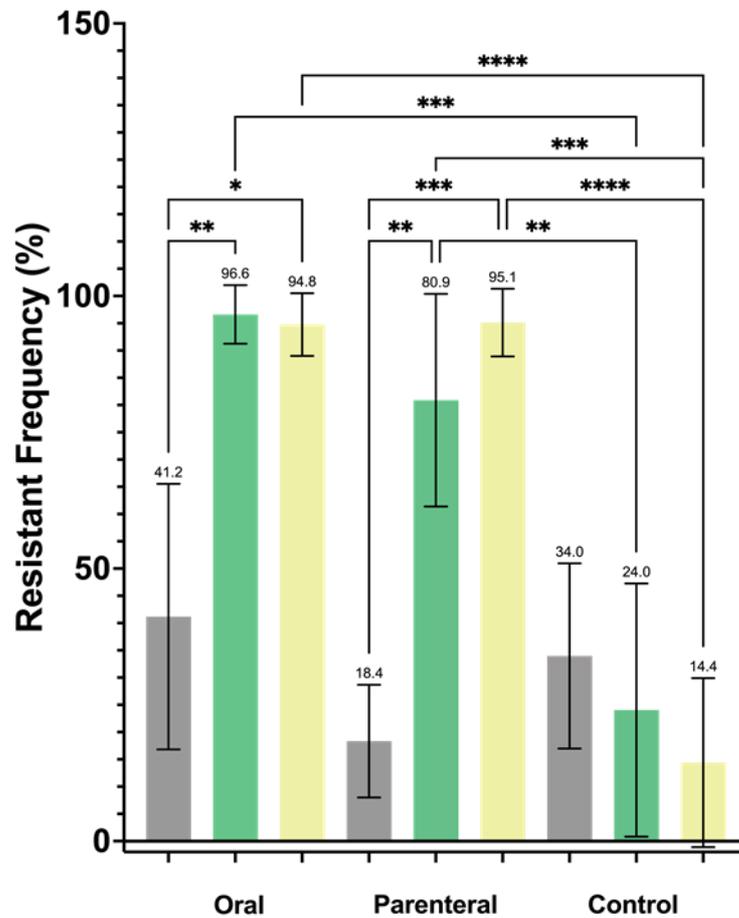


Figura 1. Comparación de la frecuencia (eje Y) de los tres grupos de tratamiento (eje X). En cada grupo: oral, parenteral y control, se muestra de color gris el periodo Pre-antibiótico (T1), de color verde el periodo de administración de antibiótico (T2) y de amarillo el periodo post-antibiótico (T3). Se muestra la significancia estadística de las comparaciones en cada una de las barras con líneas conectadas con los asteriscos (*) que indican niveles de significancia, en las que los valores P se informan en estilo GraphPad: 0,0332(*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0,0001(****). El ensayo se realizó con un intervalo de confianza del 95%, que se muestra en cada barra.

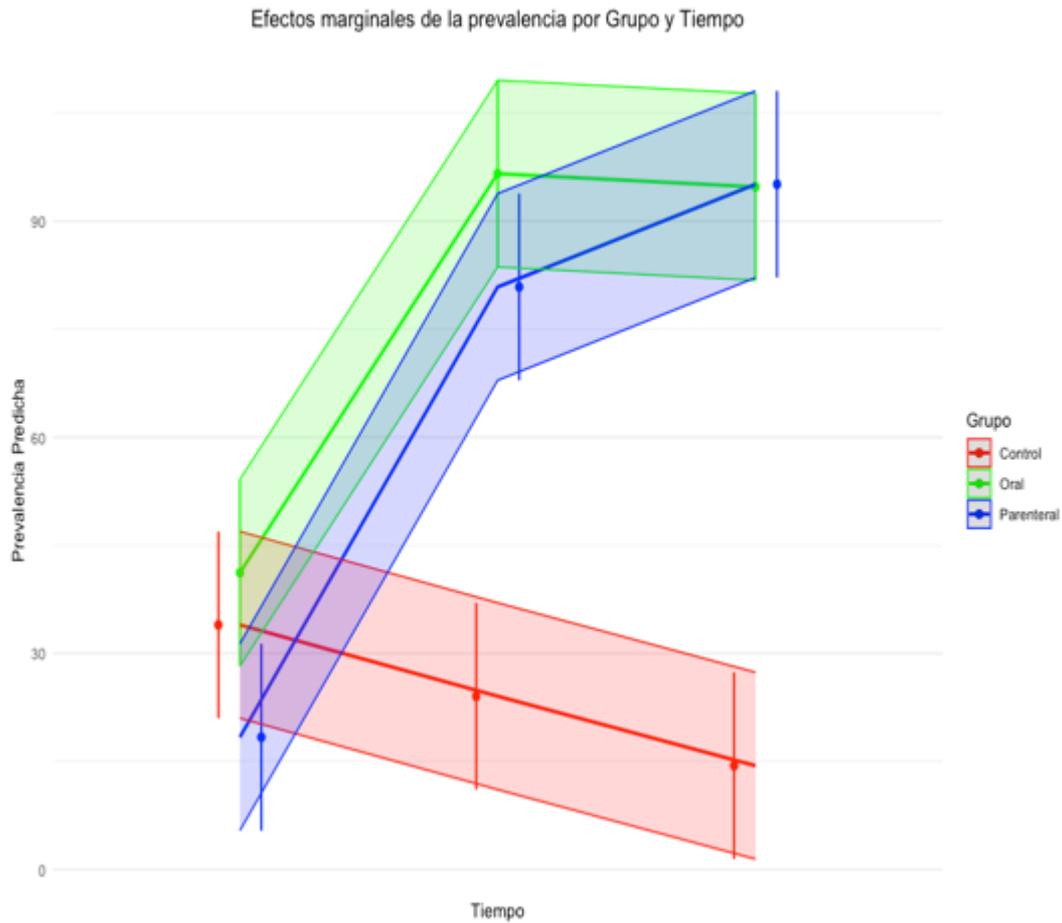


Figura 2. Comparación de la prevalencia predicha en pollos de engorde, a lo largo del tiempo, bajo las vías de administración con ceftriaxona. Grupo control (rojo), sin administración del antibiótico, Administración del antibiótico vía parenteral (azul). Administración del antibiótico vía oral (verde). Las áreas sombreadas alrededor de las líneas representan los intervalos de confianza, indicando la variabilidad de los datos. Un intervalo más ancho refleja mayor incertidumbre en las estimaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, K. (2011). *Antimicrobial Residue and Prevalence of Indicator Bacteria Having Antimicrobial Resistance Isolated from Marketed Poultry in Kathmandu, Nepal*. [Tesis de Masterado, Chiang Mai University and Freie Universitat Berlin], CMUIR.CMU.
- Amancha, G., Celis, Y., Irazabal, J., Falconi, M., Villacis, K., Thekkur, P., Nai, D., Perez, F. y Verdonck, K. (2023). High levels of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* from poultry in Ecuador. *Pan American Journal of Public Health*, 47, 1 – 9.
<https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2023.v47/e15/en>
- Cavaliere, S. (2005). Pruebas de la CIM. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.
<https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/05.pdf>
- Eltai, N., Yassine, H., El-Obeid, T., Al-Hadidi, D., Al Thani, A. y Alali, W. (2020). Prevalence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Local and Imported Retail Chicken Carcasses. *Journal of Food Protection*, 12, 2200-2208.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22103704>
- Gonzales, E., Patiño, L., Ore, E., Martínez, V., Moreno, S., Cruzado, N., Rojas, R., del Carmen, M., Carbonell, I., Villarreal, F., Maza, G., Olivo, J., Vicuña, R. y Bustamante, D., (2019). β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 30(4). 242–248. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v30n4/a05v30n4.pdf>
- Huygens, J., Daeseleire, E., Mahillon, J., Van, D., Decrop, J., Meirlaen, J., Dewulf, J., Heyndrickx, M. y Rasschaert, G. (2021). Presence of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistant Bacteria in Cattle Manure Intended for Fertilization of Agricultural Fields: A One Health Perspective. *Antibiotics*, 10(4):410.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8069554/#:~:text=Those%20antibiotic%20residues%20and%20resistant,feed%20%5B3%2C8%5D>.
- Levison, M. y Levison, J. (2009). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infect Dis Clin North Am*, 23(4):791. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3675903/>
- National Library of Medicine. (2021). *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643977/#:~:text=The%20cephalosporins%20are%20a%20family,has%20a%20variable%20side%20chain>.
- Oromí, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36(10). 367-370.

<https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-losantibioticos-10022180>

Toai, B., Preeti, P. y Preuss, C. (2024). Cephalosporins. *StatPearls*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>

Vega, O. (2023). *Determinación de residuos de fármacos en los huevos de gallinas (Gallus gallus domesticus) comercializados en el cantón Machala Provincia de El Oro*. [Trabajo de Pregrado, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio UTMACHALA.

https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/22677/1/Trabajo_Titulacion_2925.pdf

Vijay, B., Rahul, G. y Cascella, M. (2023). Third-Generation Cephalosporins. *StatPearls*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549881/>

Zhou, X., Wang, J., Lu, C., Liao, Q., Owino, F. y Ling, W. (2020). Antibiotics in animal manure and manure-based fertilizers: Occurrence and ecological risk assessment. *Chemosphere*, 255.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653520311991>

ANEXO 1: ESQUEMA DE LA FASE EXPERIMENTAL DE ALIMENTACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

