

## Estudio de la biota de ratas de bioterio: caracterización de *Escherichia coli* comensal

### Study of the biota of laboratory rats: characterization of commensal *Escherichia coli*

Xochitl Vega-Manriquez<sup>1</sup>, Omar Hernández-Fraga<sup>1</sup>, Juan Manuel Pinos-Rodríguez<sup>2</sup>, Cesar Martínez-Benítez<sup>3</sup>, Ulises Hernández-Chiñas<sup>4</sup>, Carlos Eslava-Campos<sup>4,5</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue caracterizar cepas de *E. coli* aisladas de *Rattus norvegicus* pertenecientes a un bioterio de nivel 1. Se tomaron muestras de heces a 13 ratas. Se seleccionaron cinco colonias al azar del crecimiento primario del cultivo de cada individuo muestreado. Se realizaron pruebas bioquímicas y en las cepas que fueron identificadas como *E. coli* se estableció el patotipo y el filogrupo por medio de la técnica de PCR. Además, se realizaron pruebas para la formación de biopelículas y la susceptibilidad antimicrobiana. El 65% (26/40) de las cepas aisladas correspondieron a *E. coli*. El análisis

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, México

<sup>3</sup> Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), México

<sup>4</sup> Unidad de Investigación Básica y Clínica en Enfermedades Infecciosas, Departamento de Salud Pública/División de Investigación. Facultad de Medicina UNAM (Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana ubicado en la Unidad de Hemato-Oncología e Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez en convenio con la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México)

<sup>5</sup> E-mail: [eslava@unam.mx](mailto:eslava@unam.mx); [carlos\\_01eslava@yahoo.com.mx](mailto:carlos_01eslava@yahoo.com.mx)

El proyecto fue parcialmente financiado por el Fondo de Apoyo a la Investigación «FAI» de la UASLP: C13-FAI-03047.47 y C16-FAI-09-06-06

Recibido: 21 de julio de 2021

Aceptado para publicación: 1 de marzo de 2022

Publicado: 27 de abril de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

mediante PCR mostró que todas se agruparon en el filogruppo B2. Seis de las cepas de *E. coli* presentaban resistencia a nitrofurantoina (23%), cuatro fueron resistentes a ampicilina (15%) y en tres cepas se observó resistencia a cefozolina (11%). Ninguna mostró la formación de biopelículas, ni la amplificación de genes relacionados a algún patotipo. Los resultados denotan que *E. coli* perteneciente a la biota de ratas de bioterio presenta resistencia a antibióticos y la presencia de los genes *chuA* y *yjaA* que incluyen a las cepas en el filogruppo B2 relacionado a enfermedades extraintestinales.

**Palabras claves:** *E. coli*, animales laboratorio, microbiota

## ABSTRACT

The aim of this study was to characterize strains of *E. coli* isolated from *Rattus norvegicus* belonging to a level 1 animal facility. Faecal samples were taken from 13 rats. Five colonies were randomly selected from the primary growth of the culture of each sampled individual. Biochemical tests were performed and the pathotype and phylogroup were established in the strains that were identified as *E. coli* by means of the PCR technique. In addition, tests for biofilm formation and antimicrobial susceptibility were performed. Results showed that 65% (26/40) of the isolated strains corresponded to *E. coli* and all clustered in phylogroup B2. Six of the *E. coli* strains were resistant to nitrofurantoin (23%), four were resistant to ampicillin (15%), and three strains were resistant to cefozolin (11%). None showed the formation of biofilms, nor the amplification of genes related to any pathotype. The results denote that *E. coli* belonging to the biota of laboratory rats presents resistance to antibiotics and the presence of the *chuA* and *yjaA* genes associated with the B2 phylogroup strains related to extraintestinal diseases.

**Key words:** *E. coli*, laboratory animals, microbiota

## INTRODUCCIÓN

Los animales de laboratorio utilizados en investigación biomédica o para la producción de reactivos biológicos requieren estar libres de patógenos debido a que pueden alterar sus características fisiológicas (Baker, 1998; Nicklas, 2002). *Escherichia coli* no se considera como una bacteria que ocasione enfermedades comunes en estos animales (Baker, 1998), existiendo escasa información sobre la presencia de *E. coli* patógena en la microbiota de los animales de bioterio.

*E. coli* es una bacteria con diversas variantes que normalmente se encuentran colonizando el intestino del humano y de los animales (Majowicz *et al.*, 2014), formando

parte de la biota, ya que han logrado una simbiosis en los procesos metabólicos e incluso algunas cepas sintetizan cofactores y protegen al hospedero de la invasión por microorganismos patógenos (Jang, 2017). No obstante, hay algunas cepas de *E. coli* que, debido a mecanismos de intercambio de material genético, han adquirido la capacidad de ocasionar infecciones entéricas. Estas se clasifican en seis patotipos diarrogénicos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Croxen *et al.*, 2013). Además, se encuentran diversos patotipos asociados con infecciones extraintestinales en las que se incluyen cepas causantes de infección de vía urinarias conocidas como uropatógena (UPEC), otras más

responsables de meningitis (MNEC) en recién nacidos y clonas involucradas en cuadros de septicemia (SEPEC) y patógenas de aves (APEC) que también pueden causar infecciones urinarias (Kaper *et al.*, 2004).

Ensayos de enzimas multilocus primero y posteriormente de secuencias multilocus integraron a *E. coli* en diferentes filogrupos. Clermont *et al.* (2013) utilizando un ensayo de PCR múltiple en el que se identifican algunos genes específicos lograron establecer un procedimiento práctico para definir los filogrupos de la bacteria (A, B1, B2, C, D, E y F). Con dicho procedimiento se corroboró que los filogrupos B2, D, E y F corresponden a cepas patógenas, mientras que los grupos filogenéticos A, B1 y C integran a las cepas comensales que constituyen la microbiota del intestino (Clermont *et al.*, 2013; Leimbach *et al.*, 2013).

La barrera entre simbiosis y virulencia es el resultado de un complejo balance entre el estado del hospedero y la presencia y expresión de factores de virulencia en la bacteria (Pérez-Brocal *et al.*, 2013). Esto adquiere importancia en *E. coli* debido a que puede presentar diferentes patotipos, filogrupos y serotipos que se relacionan con la etiopatogenia de varias enfermedades en humanos, algunas de las cuales pudieran ser de origen zoonótico. Ante ello, se requiere evaluar los animales que se utilizan en investigación con el interés de verificar en forma periódica el posible ingreso de nuevos microorganismos que puedan introducir cambios o variables en los reactivos de investigación. Es por lo que el objetivo del presente trabajo fue conocer si en la microbiota intestinal de ratas Wistar de una colonia de bioterio se encontraban cepas de *E. coli* patógenas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se obtuvieron de una población de trece ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) pertenecientes a un bioterio ni-

vel 1 ubicado en la zona centro de México. el cual durante ese periodo no contaba con ISO o certificación en calidad ante alguna institución normativa en esta materia; sin embargo, el bioterio se regía en altos estándares de calidad impuestos por los manuales y reglamentos internos, así como las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) dado que se trata de un bioterio de barrera. Los individuos se muestrearon siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el reglamento de bioseguridad del bioterio. Los animales se mantuvieron alojados en cajas (modelo GR900, Techniplast) con ventilación individual y filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air). La temperatura del lugar de alojamiento era controlada dentro de un rango de 20 a 23 °C y humedad relativa entre 50 y 60%. El material de cama y el agua se esterilizaba mediante autoclave y el alimento PicoLab Roden Diet 20 5053 (LabDiet) estaba irradiado. El agua y alimento se ofrecía *ad libitum*.

En el lapso en el que fue realizado el estudio, las ratas se encontraban aisladas en un cuarto específico para la estabulación de esta especie y cepa. En otras salas igualmente aisladas se encontraba una colonia de ratones C57BL/6. Los equipos, materiales, insumos y alimentos de cada grupo eran específicos para la especie. El fin de estos animales y cepas era la investigación biomédica y producción.

Se tomaron muestras de heces de la zona del ano utilizando hisopos estériles impregnados con solución salina fisiológica (SSF), considerándose suficiente la cantidad colectada de heces por este medio. Los hisopos se depositaron en medio de transporte de agar Stuart y se refrigeraron hasta su siembra en un periodo menor a 24 h. Las muestras se sembraron en agar MacConkey y se incubaron durante 18 h a 37 °C. Posterior al crecimiento se seleccionaron al azar 5 colonias por muestra (3 lactosas positivas y 2 lactosas negativas). Se obtuvieron 39 colonias lactosas positivas y 26 lactosas negati-

vas, dando un total de 65 aislamientos. Las cepas aisladas se identificaron por medio de pruebas bioquímicas para fermentación de glucosilactosa, indol, VP, urea, malonato, fenil alanina, motilidad, y producción de ácido sulfhídrico.

A las cepas identificadas como *E. coli* se les extrajo DNA por ebullición, tomándose el sobrenadante. El DNA fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Se utilizó la técnica de la PCR para identificar si presentaban genes asociados a los patotipos ETEC, EPEC, EIEC, y EHEC patógenos para humanos. Las condiciones para la PCR se realizaron según lo reportado por López-Saucedo *et al.* (2003) con modificaciones propias. Se desarrolló la amplificación de los genes de manera individual, utilizando 2 µl de PCR Master Mix 2X (Thermo, Científica USA), 0.5 µM de cada iniciador, 0.5 µg de ADN molde, ajustando a un volumen de 20 µl con agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C (1 min, 1 ciclo), 30 ciclos a 95 °C, alineamiento 55 °C y solo para *st* fue de 48 °C y una extensión a 72 °C (30 s por cada temperatura), una extensión final a 72 °C por 5 min. Como controles positivos para el patotipo ETEC se utilizó la cepa H10407 (*lt*, *st*), para EHEC EDL 933 (*eaeA*, *stx1*, *stx2*), EIEC O136: NM (*ial*) y para EPEC la cepa E2348 / 69 (*bfpA*, *eaeA*), y un control negativo de solo agua.

Para identificar los filogrupos de las cepas de *E. coli* se aplicó la técnica de PCR multiplex (Clermont *et al.*, 2000). Las PCR se llevaron a cabo en el termociclador MiniAmp (Applied Biosystems, USA). Los productos de ambos PCR se corrieron en geles de agarosa en TBE al 1% y se tiñeron con Gel Red TM Nucleic acid Gel Stain, 10000X en agua, y se visualizaron en un transiluminador de rayos UV (UVP, USA). El tamaño de las amplificaciones se determinó por comparación con el marcador de talla molecular escalera de 100 pb (Thermo Scientific, USA).

Para los ensayos de formación de biopelículas se utilizó el protocolo descrito por de Oliveira-García *et al.* (2003) con modificaciones propias utilizando las cepas de *E. coli*, O42 (OND:H10) enteroagregativa y la cepa HB101 (*E. coli* K12) como controles positivo y negativo respectivamente. Las células tratadas se tiñeron con cristal violeta al 1% y por medio de un espectro se determinó la formación de biopelículas a 630 nm de densidad óptica (DO), comparando con los controles negativos.

La susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos se evaluó realizando una suspensión bacteriana de *E. coli* en SSF con una densidad igual al tubo N.º 0.5 del Nefelómetro de McFarland, se sembró en medio Müller-Hinton, se colocaron sensidiscos con 15 antibióticos (Oxoid, UK) (Cuadro 1) y se incubó durante 18 a 24 h a 37 °C en aerobiosis. La lectura se realizó midiendo el diámetro del halo de inhibición y para la interpretación se utilizaron los criterios del manual del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLS, 2018).

## RESULTADOS

De las 13 ratas se aislaron 65 cepas que se identificaron y conservaron; sin embargo, al sembrarlas nuevamente para su caracterización solo se recuperaron 40 cepas que fueron incluidas en el estudio de caracterización. Utilizando un esquema de pruebas bioquímicas más completo se pudo definir que 26/40 cepas (65%) correspondieron a *E. coli*, 9 (22.5%) a *Proteus mirabilis*, 4 (10%) a *Citrobacter freundii* y una (2.5%) a *Proteus vulgaris*. Las cepas de *E. coli* que fueron caracterizadas provinieron de ocho ratas (61.5%).

El ensayo de PCR para definir la presencia de genes de virulencia en las cepas de *E. coli* recuperadas mostró que ninguna de ellas amplificó los marcadores genéticos que

Cuadro 1. Susceptibilidad antimicobiana de cepas de *E. coli* aisladas de 13 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) pertenecientes a un bioterio nivel 1 de la zona centro de México

Antibiótico	Sensibles		Intermedio		Resistentes	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina (AMP) 10 µg	12	46.2	10	38.5	4	15.4
Amox-Ácido clavulánico (AMC) 20-10 µg	23	88.5	3	11.5	0	0
Piperacilina-Tazobactam (TZP) 100-10 µg	24	92.3	1	3.8	1	3.8
Cefozolina (KZ) 30 µg	21	80.8	2	7.7	3	11.5
Ceftriaxona (CRO) 30 µg	26	100.0	0	0	0	0
Furoxime (CXM) 30 µg	7	26.9	18	69.2	1	3.8
Meropenem (MEM) 10 µg	26	100.0	0	0	0	0
Nitrofurantoina (F) 300 µg	17	65.4	3	11.6	6	23.1
Gentamicina (CM) 10 µg	25	96.2	0	0	1	3.8
Amikacina (KA) 30 µg	25	96.2	0	0	1	3.8
Tetraciclina (TE) 30 µg	23	88.5	3	11.6	0	0
Ciprofloxacina (CIP) 5 µg	26	100.0	0	0	0	0
Ácido nalidixico (NA) 30 µg	25	96.2	1	3.8	0	0
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT) 1.5/23.75 µg	26	100.0	0	0	0	0
Fosfomicina (FOS) 200 µg	26	100.0	0	0	0	0

las asociara con algún patotipo de cepas causantes de diarrea (EPEC, EAEC, EIEC, ETEC y EHEC). Sin embargo, el ensayo para conocer el filogrupo mostró la amplificación de *chuA* y *yjaA*, genes que permiten incluirlas en el grupo B2 de cepas responsables de infecciones extraintestinal (ExPEC). Por otro lado, en todos los ensayos de caracterización los controles positivos amplificaron para los productos esperados.

Las cepas de *E. coli* caracterizadas como pertenecientes al filogrupo B2 no formaron biopelículas en los dos tiempos de incubación (24 y 48h), presentando una DO similar a la del control negativo (24h 0.01, y

48h 0.0032). Por otro lado, la lectura a las 24h y 48h de incubación para el control positivo de la cepa O42 presentó una DO de 0.034 y de 0.083, respectivamente.

El ensayo de susceptibilidad a los antimicrobianos de las 26 cepas identificadas como *E. coli* mostró que 6/26 (23%) fueron resistentes a alguno de los antibióticos analizados (Cuadro 1). Los antibióticos a los que presentaron mayor resistencia fueron la nitrofurantoina (23.1%, [6 cepas]), ampicilina (15.4%, [4 cepas]) y cefozolina (11.5%, [3 cepas]). Solo una cepa presentó multiresistencia a cinco antibióticos, tres a tres antibióticos, una a dos y una a solo un antibiótico.

## DISCUSIÓN

Para conocer la calidad de los animales de laboratorio y definir si pudieran ser de utilidad para algunos ensayos es importante caracterizar su microbiota intestinal. *E. coli* es un integrante de dicha microbiota; sin embargo, la adquisición de genes relacionados con virulencia, incluidos los asociados a resistencia a los antimicrobianos, en su proceso evolutivo ha dado lugar a la emergencia de clonas patógenas responsables de diferentes cuadros clínicos, de allí que su presencia en animales de laboratorio podría convertirse en un riesgo para la salud pública (Puvaca, 2021). En el presente estudio, si bien ninguna de las cepas estudiadas presentaba genes de virulencia relacionados con alguno de los patotipos asociados con enfermedad en humanos o animales, fue interesante observar que amplificaron *chuA* y *yjaA*, genes asociados con el filogrupa B2 relacionado con cepas causantes de infecciones extraintestinales (Khairy *et al.*, 2019). Al respecto este filogrupa se ha aislado de caballos en Japón donde las cepas mostraron patrones de multiresistencia (Sato *et al.*, 2020), similar a lo observado en este estudio.

La multiresistencia a antibióticos es un problema de actualidad que cada vez adquiere mayor relevancia (OMS, 2019). Es por ello que se requieren estudios que muestren el comportamiento de bacterias de animales y humanos e implementar nuevas alternativas para el manejo de las enfermedades infecciosas y el control más estricto del empleo de antimicrobianos, tanto en humanos como en animales (Hernando-Amado *et al.*, 2019). No obstante que en el presente estudio el porcentaje de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos fue de 23.1% (6 cepas) y solo una mostró multiresistencia (3.8%), estos resultados deben de ser considerados de importancia ya que los animales del estudio forman parte de un ecosistema donde interactúan con seres humanos y pueden ser la fuente de transmisión de estos patógenos con resistencia a los antimicrobianos (Hernando-Amado *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos plantean preguntas a responder sobre el origen de la resistencia de las bacterias aisladas en animales de un bioterio que cuenta con protocolos de bioseguridad y cuya población son parte de una colonia cerrada. Al respecto, Bengtsson-Palme *et al.* (2018) refieren a cepas resistentes influenciadas por las condiciones del ambiente y las características específicas del microorganismo que presentan la capacidad de adquirir genes con mayor facilidad, lo que favorecería la facilidad de adaptación de la bacteria en reservorios con los que el humano tiene gran interacción. Es por ello la relevancia de definir si las bacterias de humanos se han adaptado a vivir en los animales y estos ser la fuente de transmisión y, por ende, de la etiología de diferentes padecimientos cada vez más difíciles de controlar.

## CONCLUSIONES

Cepas de *Escherichia coli* aislada de microbiota intestinal de ratas de bioterio presentaron los genes *chuA* y *yjaA* del filogrupa B2, así como resistencia a diversos antibióticos, lo cual adquiere relevancia debido a el riesgo que puede implicar en el ámbito de salud pública.

## LITERATURA CITADA

1. **Baker DG 1998.** Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. Clin Microbiol Rev 112: 231-266. doi: 10.1128/CMR.11.2.231
2. **Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. 2018.** Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 42: fux053. doi: 10.1093/femsre/fux053
3. **Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013.** The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing

- method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups *Env Microbiol Rep* 5: 58-65. doi: 10.1111/1758-2229.12019
4. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microb* 66: 4555-4558. doi: 10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000
  5. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28<sup>th</sup> ed. CLS supplement M100. Wayne, PA, USA: CLSI.
  6. **Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013.** Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26: 822-80. doi: 10.1128/CMR.00022-13
  7. **de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcántara N, Martínez MB, Girón JA. 2003.** Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* 5: 625-36. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00306.x
  8. **Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. 2019.** Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* 4: 1432-1442. doi: 10.1038/s41564-019-0503-9
  9. **Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. 2017.** Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications - a review. *J Appl Microbiol* 123: 570-581. doi: 10.1111/jam.13468
  10. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818
  11. **Khairy RM, Mohamed ES, Abdel Ghany HM, Abdelrahim SS. 2019.** Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One* 14: e0222441. doi: 10.1371/journal.pone.0222441
  12. **Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. 2013.** *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol* 358: 3-32. doi: 10.1007/82\_2012\_303
  13. **López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Tarr PI, et al. 2003.** Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 9: 127-131. doi: 10.3201/eid0901.01-0507
  14. **Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, Sargeant JM, Stapleton J, Angulo FJ, Yeung DH, et al. 2014.** Global incidence of human shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog Dis* 11: 447-455. doi: 10.1089/fpd.2013.1704
  15. **Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B. 2002.** Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Animal* 36: 20-42. doi: 10.1258/0023677021911740
  16. **Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.** 199. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [Internet]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
  17. **Pérez-Brocal V, Latorre A, Moya A. 2013.** Symbionts and pathogens: what is the difference?. *Curr Top Microbiol* 358: 215-243. doi: 10.1007/82\_2011\_190
  18. **Puvaèa N, de Llanos Frutos R. 2021.** Antimicrobial resistance in *Escherichia*

- coli* strains isolated from humans and pet animals. *Antibiotics* 34: 363-370. doi: 10.5713/ajas.20.0140
19. **Sato W, Sukmawinata E, Uemura R, Kanda T, Kusano K, Kambayashi Y, Sato T, et al. 2020.** Antimicrobial resistance profiles and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from healthy Thoroughbred racehorses in Japan. *J Equine Sci* 31: 85-91. doi: 10.1294/jes.31.85#
20. **[WHO] World Health Organization. 2019.** Proxy indicators for antibiotic consumption; surveillance needed to control antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ* 97: 3-3A.