



## CARACTERIZACIÓN DE CEPAS AVIARES DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* MEDIANTE LA PRUEBA DE LETALIDAD EMBRIONARIA

Blanco, Ana E.

Tutor: Buxadé, Carlos

Departamento de Producción Agraria. E.T.S.I. Agronómica Alimentaria y de Biosistemas - UPM  
blanco.g.ana@gmail.com

### RESUMEN

*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) es el agente causante de la Artropatía Amiloide (AA) en las aves. Dada la dificultad de estimar el riesgo que suponen las cepas de campo de esta bacteria, en la presente experiencia se caracterizaron 68 cepas de *E. faecalis* mediante la prueba de letalidad embrionaria (ELA) utilizando la tasa de mortalidad embrionaria (TME). Se realizaron un total de 10 ELAs con subgrupos de 7 u 8 cepas y dos grupos control (positivo y negativo). Se utilizaron 100 huevos fecundados por cepa y grupo control. Según la cepa, se inocularon de 3 a 24 unidades formadoras de colonias (ufc) en la cavidad alantoidea de embriones de 10 días de edad. Durante 7 días se registró diariamente la TME mediante ovoscopia. La ELA fue capaz de diferenciar las cepas de *E. faecalis* con respecto a la TME que produjeron. Se clasificaron 26 cepas de *E. faecalis* como avirulentas (TME<40%), 5 cepas fueron altamente virulentas (TME>80%) y las 37 cepas restantes presentaron moderada virulencia con una TME de 40 a 80%. La mayor TME se registró 3 días post inoculación. A partir del 4º día apenas se observó mortalidad embrionaria, por lo que la ELA podría ser optimizada reduciendo el tiempo de observación a 4 días. Se puede concluir que la ELA es una herramienta fiable y útil para predecir la virulencia de cepas aviarias de *E. faecalis* utilizando la TME. Las cepas altamente patógenas probadas podrían ser candidatas para el desarrollo de vacunas autógenas.

**Palabras clave:** *Enterococcus faecalis*, prueba de letalidad embrionaria, virulencia.

### INTRODUCCIÓN

La artropatía amiloide (AA) en las gallinas ponedoras se caracteriza por la deposición de amiloide naranja en las articulaciones de la rodilla y en el corvejón, aparición de cojeras y una depresión en el crecimiento de la pollita, lo que conlleva posteriormente a una disminución de la puesta, traducándose en unas pérdidas económicas para el ganadero (Blanco *et al.*, 2016). La AA es el único tipo de amiloidosis asociado con infecciones crónicas inducidas por cepas artropáticas y amiloidogénicas de *E. faecalis* (Landman *et al.*, 1998).

El tratamiento de la AA se basa en la supresión de la infección crónica producida por las cepas de *E. faecalis*, pero éste es cada vez más limitado debido, por un lado, a la resistencia intrínseca y adquirida de esta bacteria hacia los antimicrobianos, como fue revisado por Blanco *et al.* (2016) y, por otro lado, debido a las directrices para reducir la utilización de los antimicrobianos en la producción animal.

Se necesita por lo tanto un mayor conocimiento del riesgo que suponen las cepas de campo de *E. faecalis* para poder desarrollar estrategias de control efectivas para reducir la tasa de incidencia de la AA y, por consiguiente, garantizar el bienestar de los animales y mejorar el rendimiento económico de las explotaciones.

En un estudio previo desarrollamos una metodología genérica para poder evaluar la virulencia de cepas aviarias de *E. faecalis* utilizando la prueba de letalidad embrionaria (ELA) (Blanco y Buxadé, 2016). En la presente experiencia el objetivo fue caracterizar diferentes cepas de *E. faecalis* aisladas en casos de campo de AA mediante la ELA, y así poder corroborar la capacidad de dicho modelo para discriminar entre cepas virulentas y cepas no virulentas de esta bacteria.



## MATERIAL Y MÉTODOS

**Prueba de letalidad embrionaria (ELA).** Se realizaron diez ELAs (I-X) como se describe en nuestra investigación previa (Blanco y Buxadé, 2016). Se evaluaron un total de 69 cepas aviares de *Enterococcus spp.* (1 cepa de *E. hirae* y 68 cepas de *E. faecalis*). En cada ELA individual se incluyeron siempre 7 u 8 cepas, un control positivo (cepa de *E. faecalis* K923/96, conocida y bien caracterizada por Rudolph (2004), Petersen *et al.* (2009), y Blanco y Buxadé (2016)) y un control negativo. Se utilizaron 100 huevos fecundados de gallinas Lohmann de estirpe blanca de 29 a 62 semanas de edad por cepa y grupo control. Los embriones se inocularon en la cavidad alantoidea a los 10 días de edad con una dosis de infección teórica de 5 unidades formadoras de colonia (ufc)/ml (Blanco y Buxadé, 2016). Para un volumen de inoculación de 0,2 ml/huevo, y de acuerdo con la verificación de la dosis, se inocularon de 3 a 24 ufc/huevo según la cepa de *E. faecalis*, como se muestra en la Figura 1. Los embriones del grupo control negativo se inocularon en la cavidad alantoidea con 0,2 ml de tampón fosfato salino (PBS) estéril. Durante 7 días se registró diariamente la tasa de mortalidad embrionaria (TME) mediante ovoscopia. Basándonos en esta información se clasificaron las cepas como se muestra en la Tabla 1 (Rudolph, 2004). Es importante mencionar que los embriones que murieron durante las primeras 24 horas tras la inoculación no se tuvieron en cuenta para la evaluación de la virulencia dado que estas muertes se atribuyen al trauma que sufren los embriones durante la inoculación (Wooley *et al.*, 2000).

**Tabla 1. Evaluación de la virulencia (Rudolph, 2004).**

Grado de virulencia	TME 7 días post inoculación
Bajo	< 40 %
Medio	40 – 80 %
Alto	> 80 %

Al final de cada ELA, a los 17 días de incubación, los embriones que sobrevivieron se almacenaron durante 48 horas a una temperatura de 4 °C. Se seleccionaron aleatoriamente embriones que murieron y que sobrevivieron a la infección para su examen macroscópico, y para reaislar las cepas de *E. faecalis* a partir de muestras de líquido alantoideo.

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico de los datos de mortalidad se realizó utilizando un modelo de supervivencia, así como aplicando un modelo lineal generalizado con una variable de respuesta binaria (1 si el embrión muere o 0 si el embrión sobrevive). Los parámetros estimados en la escala logit se transformaron de nuevo utilizando la función de enlace inversa. Se utilizaron los procedimientos GLIMMIX y LIFETEST del paquete estadístico SAS/STAT 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ELA fue capaz de diferenciar las cepas de *E. faecalis* con respecto a la TME que produjeron, como se muestra en la Figura 1. Basándonos en la Tabla 1, se clasificaron 26 cepas de *E. faecalis* como avirulentas, 5 cepas fueron altamente virulentas y las 37 cepas restantes presentaron moderada virulencia (Figura 1). Por lo tanto, la virulencia de las cepas de *E. faecalis* puede clasificarse según la TME que producen mediante la ELA, confirmando los resultados obtenidos por otros autores con cepas de *Escherichia coli* (Wooley *et al.*, 2000, Gibbs *et al.*, 2003; Montgomery *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2012), *Yersinia enterocolitica* (Townsend *et al.*, 2008), *Campylobacter jejuni* (Stewart-Tull *et al.*, 2009), *Staphylococcus aureus* (Polakowska *et al.*, 2012), *Riemerella anatipestifer* (Seo *et al.*, 2013) y *Enterococcus cecorum* (Borst *et al.*, 2014).

La TME media del grupo control negativo fue 1%, lo cual indica el apropiado entorno de la incubadora durante las ELAs y el bajo impacto negativo de la inyección.





aconsejan tener cuidado al definir la virulencia de una cepa basándose únicamente en una ELA.

De acuerdo con la literatura mencionada, la mayor TME se registró el día 3 post inoculación, y a partir del 4° día la TME apenas sufrió variación. Por lo tanto, la ELA podría ser optimizada reduciendo el tiempo de observación a 4 días, como fue previamente propuesto por Wooley *et al.* (2000) y Montgomery *et al.* (2005) con cepas de *E. coli*.

Todos los embriones infectados durante el estudio mostraron las mismas lesiones independientemente de la cepa, en contraste con los resultados de Wooley *et al.* (2000), quienes reportaron que las lesiones macroscópicas podrían ayudar a diferenciar la virulencia de cepas de *E. coli*. Las lesiones provocadas por las cepas de *E. faecalis* fueron las mismas observadas en nuestro estudio previo (Blanco y Buxadé, 2016) y en los embriones infectados con cepas de *E. cecorum* (Borst *et al.*, 2014); malformaciones, edemas subcutáneos, hemorragias craneales, pérdida de plumaje y subdesarrollo.

El re-aislamiento bacteriano de los embriones infectados, tanto muertos como supervivientes al final de la prueba, fue siempre positivo en *E. faecalis*. Sin embargo, los embriones del grupo control negativo no mostraron ninguna lesión y no se re-aislaron *E. faecalis*, lo cual indica que el experimento fue fiable y la mortalidad embrionaria fue causada únicamente por la infección y no por agentes externos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que la ELA puede considerarse una herramienta fiable y útil para predecir la virulencia de cepas aviarias de *E. faecalis* utilizando la TME. Además, la ELA puede ser optimizada reduciendo el tiempo de observación a 4 días post inoculación. Las cepas altamente patógenas probadas podrían ser candidatas para el desarrollo de vacunas autógenas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, el Prof. Dr. y Dr. Carlos Buxadé Carbó, su amistad e incondicional ayuda; a la empresa Lohmann Tierzucht GmbH la oportunidad que me ha brindado para poder desarrollar el doctorado, y al Dr. R. Sharifi su colaboración y apoyo en el análisis estadístico de los datos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A. E. & Buxadé, C. (2016). VIII Congreso de Estudiantes Universitarios de Ciencia.Tecnología e Ingeniería Agronómica, España, Madrid, pp : 71 – 74.
- Blanco, A. E., Barz, M., Icken, W., Caveró, D., Mazaheri, A., Voss, M., Schmutz, M. & Preisinger, R. (2016). *World's Poultry Science Journal*, 72(3):495-508.
- Borst, L. B., Suyemoto, M. M., Keelara, S., Dunningan, S. E., Guy, J. S. & Barnes, H. J. 2014. *Avian Disease*, 58: 244-248.
- Gibbs, P. S., Maurer, J. J., Nolan, L. K. & Wooley, R. E. (2003). *Avian diseases*, 47(2): 370-379.
- Landman, W. J. M., Gruys, E. & Gielkens, A.L.J. (1998). *Avian Pathology*, 27(5):437-449.
- Montgomery, R. D., Jones, L. S., Boyle, C. R., Luo, Y. & Boyle, J. A. (2005). *Avian diseases*, 49(1): 63-69.
- Oh, J. Y., Kang, M. S., Yoon, H., Choi, H. W., An, B. K., Shin, E. G., & Kwon, Y. K. (2012). *Poultry science*, 91(2): 370-375.
- Petersen, A., Christensen, H., Philipp, H. C., & Bisgaard, M. (2009). *Veterinary microbiology*, 134(3): 392-395.
- Polakowska, K., Lis, M. W., Helbin, W. M., Dubin, G., Dubin, A., Niedziolka, J. W., & Wladyka, B. (2012). *Microbes and Infection*, 14(14): 1352-1362.
- Rudolph, B. (2004). PhD Thesis. Berlin University, Germany.
- SAS Institute Inc. (2011). *SAS/STAT 9.3 User's Guide*. Cary, NC. SAS Institute Inc.
- Seo, H. S., Cha, S. Y., Kang, M. & Jang, H. K. (2013). *Avian Pathology*, 42(4): 387-392.
- Stewart-Tull, D. E. S., Coote, J. G., Thompson, D. H., Candlish, D., Wardlaw, A. C. & Candlish, A. (2009). *Journal of medical microbiology*, 58(5): 546-553.
- Townsend, M. K., Carr, N. J., Iyer, J. G., Horne, S. M., Gibbs, P. S. & Prüß, B. M. (2008). *BMC microbiology*, 8(1): 12.
- Wooley, R., Gibbs, P., Brown, T. & Maurer, J. (2000). *Avian Diseases*, 44: 318-324.