

Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de contenidos de bursa de Fabricio de aves para engorde

Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the bursa of Fabricius in broilers

Edna Carvajal B.¹, Walter Hernández A.², María Torres C.³, Diana López V.³, Egberto Rueda G.⁴, María Vásquez R.^{1,5}

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar el porcentaje de sensibilidad o resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de pollo de engorde asintomático frente a 18 antibióticos comunes utilizados en avicultura y medicina humana; a su vez, cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEES), procedentes de granja o plantas de beneficio de la zona avícola de Santander, Colombia. Se determinó la circulación de cepas resistentes a betalactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas y sulfonamidas, así como antibióticos de amplio uso en ambientes ajenos a las granjas. Se aislaron 46 cepas de *E. coli* del contenido de bolsas de Fabricio de 100 pollos de engorde entre 2 y 6 semanas de edad (20 procedentes de una granja avícola y 80 de una planta de sacrificio) en Santander, Colombia. Las muestras fueron cultivadas en agar McConkey. Se realizaron pruebas de sensibilidad a las cepas aisladas con 18 antimicrobianos. El 91% de las cepas fueron resistentes a la ampicilina y el 80% a las cefalosporinas; así mismo, al enfrentar las cepas con la asociación de antibióticos con inhibidores de betalactamasas (ampicilina sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico), se encontró 30% de resistencia. Se utilizó la prueba del doble disco para evaluar la presencia de cepas de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEES) confirmando su presencia en el 63% de las muestras. Se evidencia la presencia de cepas de *E. coli* en aves de engorde asintomáticas, con alta resistencia antimicrobiana, incluyendo expresión de BLEES.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana; *Escherichia coli*; pollos de engorde

Bucaramanga, Colombia

² Universidad de la Paz, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Barrancabermeja, Colombia

³ Grupo de Investigación de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Boyacá, Tunja, Boyacá, Colombia

⁴ Universidad de Santander, Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias, Grupo de investigación en Ciencias Agropecuarias GICA, Bucaramanga, Colombia

⁵ E-mail: m.vasquez@udes.edu.co

Recibido: 29 de mayo de 2018

Aceptado para publicación: 15 de noviembre de 2018

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the percentage of sensitivity or resistance of strains of *E. coli* isolated from asymptomatic broiler chicken against 18 common antibiotics used in poultry and in human medicine. In addition, strains that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) from a farm or slaughterhouses in the poultry area of Santander, Colombia. The circulation of strains resistant to beta-lactams, cephalosporins, aminoglycosides, quinolones and sulfonamides was determined, as well as antibiotics widely used in other non-farm environments. The content of the bursa of Fabricius was cultivated in McConkey agar obtaining 46 strains of *E. coli*. Susceptibility tests (n=18) were conducted to the isolated strains, and 91% of the strains were resistant to ampicillin and 80% to cephalosporins. The association of antibiotics with beta-lactamase inhibitors (ampicillin sulbactam and amoxicillin / clavulanic acid) showed 30% resistance. The double disc test was used to evaluate the presence of strains of *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) confirming its presence in 63% of the samples. Results showed the presence of *E. coli* strains in asymptomatic chicken broilers with high antimicrobial resistance, including expression of ESBL.

Key words: antimicrobial resistance; *Escherichia coli*; broilers

INTRODUCCIÓN

En Colombia se produjeron 13 827 millones de huevos y 1.56 millones de toneladas de carne de pollo en 2017, cifras que ubican al país en el tercer lugar en Latinoamérica, después de México y Brasil (FENAVI, 2018). Los avances en genética, sanidad y alimentación de aves han permitido lograr altos estándares de producción (Bueno *et al.*, 2016), pero que a la vez aumenta las exigencias en temas de saneamiento y bioseguridad (Díaz, 2017). Fallas en la cadena de producción, manejo y manipulación de las aves aumentan el riesgo de encontrar microorganismos potencialmente patógenos que se vehiculizan por el alimento, aves, o sus derivados, transformando el producto en reservorio de patógenos o de microorganismos que comprometen la inocuidad de la producción (Martínez-Guardia *et al.*, 2011).

Dentro de los microorganismos de mayor impacto en la industria avícola se encuentra la *Escherichia coli* (*E. coli*), miembro de la familia de Enterobacteriaceae, y agente

causal de varios brotes epidémicos documentados en Colombia (Soto Varela *et al.*, 2016) y en otros países. Se han reportado varios serotipos en diversos lugares; por ejemplo, en España *E. coli* enteropatogénico (EPEC) O2:H40, O8:H19, O108:H9 O45:H8, O2:H40, O108:H9 y O123:H32 (Alonso *et al.*, 2014), Argentina *E. coli* Shigatoxigénico (STEC) O22:H8, O113:H21, O130:H11, O171:H2 y O178:H19 (Alonso *et al.*, 2016), Cuba O26:K60, O111:K58, O55:K69, O86:K61, además de India (Puig Peña *et al.*, 2014), Dinamarca (Ronco *et al.*, 2017) y Egipto (Amin *et al.*, 2017; El-Mongy *et al.*, 2018), entre otros.

Los productores avícolas emplean antibióticos como promotores de crecimiento para potenciar la producción, a veces sin el control debido. Así mismo, en un intento por controlar las pérdidas ocasionadas por la aparición de enfermedades, instauran tratamientos con antimicrobianos, en numerosos casos con dosis menores a las recomendadas (Briz, 2006), de modo que los microorganismos pueden llegar a adaptarse y aumentar la resistencia frente a ciertos antibióticos (Soufi *et*

al., 2011). Es conocido que la introducción no controlada de antibióticos y la multicausalidad de la resistencia bacteriana se puede potenciar en el medio por el consumo de antibióticos en la práctica avícola (Martínez *et al.*, 2014). Esto se reafirma con estudios que identifican el tránsito de patógenos resistentes en el ambiente de producción (Laube *et al.*, 2014; Mellata *et al.*, 2018), o que buscan el potencial zoonótico de dicho ambiente de producción (Mitchell *et al.*, 2015; Stromberg *et al.*, 2017).

E. coli se encuentra en el tracto gastrointestinal de las aves diseminándose ampliamente en las heces. En situaciones de estrés y bajo condiciones inadecuadas de manejo o bioseguridad se comporta como patógeno oportunista, debido a sus factores de virulencia, tomando en muchas ocasiones un curso asintomático (Perello, 2009). Esto afecta directamente los índices productivos de la industria avícola (Mantilla y Portacio, 2012; Hernández-Fillor *et al.*, 2017).

La resistencia antimicrobiana en la industria avícola está relacionada al uso indiscriminado de antimicrobianos y a la falta de control en los tratamientos. Cepas de *E. coli* multirresistentes a antibióticos son la base para la diseminación de dicha resistencia a poblaciones completas de aves de corral (Hernández-Fillor *et al.*, 2017). El principal mecanismo es la transferencia horizontal; sin embargo, se han identificado elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia; de los cuales, los más conocidos son los transposones, los plásmidos, y los cassettes genéticos de resistencia. Recientemente se ha descubierto que los integrones juegan un rol fundamental en la evolución de los genomas bacterianos, siendo los responsables de la captura y difusión de los determinantes de resistencia a los antibióticos entre diversos microorganismos Gram-negativos (Berglund, 2015). En la producción avícola la resistencia se pone en evidencia a través de estudios que caracterizan por métodos microbiológicos los patrones o fenotipos de resistencia; por lo tanto, el pre-

sente estudio tuvo como objetivo evaluar los perfiles de resistencia de *E. coli* aisladas de contenidos de bursa de Fabricio de aves para engorde.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue de tipo descriptivo de corte transversal. Se colectaron al azar 100 bolsas de Fabricio de pollos broiler entre 2 y 6 semanas de edad de una granja avícola ubicada en el Municipio de Lebrija, Santander (Colombia), entre febrero y junio de 2014. Las muestras fueron colocadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y transportadas en el menor tiempo posible al laboratorio de la Universidad de Santander para su procesamiento y evaluación. El 20% de estas muestras se obtuvieron de animales en granja y el resto de la planta de sacrificio de pollos. Las muestras se tomaron mediante corte inferior de la piel bajo el pigóstilo y vertebras coccígeas de las aves, siguiendo procedimientos antisépticos para evitar contaminaciones. Como criterio de inclusión se tomaron muestras de animales vivos, sanos y como criterio de exclusión animales enfermos o bajo tratamiento de antibióticos.

Las bolsas de Fabricio fueron lavadas externamente con una solución salina estéril, y luego fueron abiertas con un bisturí estéril. El contenido fue sembrado en agar MacConkey e incubado a 37 °C durante 24 h. Se seleccionaron las colonias que presentaron fermentación de lactosa. La identificación de cada colonia se hizo mediante el sistema comercial Crystal E/NF de BBL, el cual consta de un panel de sustratos para evidenciar las propiedades bioquímicas de las bacterias Gram negativas. Como control de referencia se tomó la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Para determinar el perfil de susceptibilidad se empleó la técnica de Kirby-Bauer (Cona, 2002); siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Cada cepa se expuso

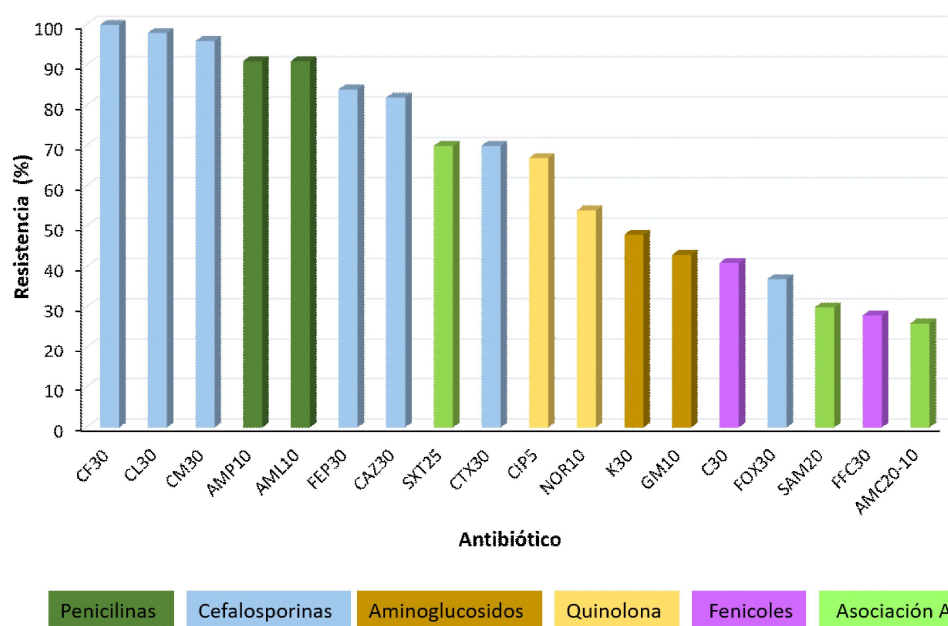


Figura 1. Porcentaje de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de bolsas de Fabricio de pollos de engorde a los antibióticos betalactámicos y antibióticos adicionados con inhibidores de betalactamasas

a 18 antibióticos con sensidiscos Oxoid® para ampicilina (AMP10), ampicilina sulbactam (SAM20), amoxicilina (AML10), amoxicilina/ácido clavulánico (AML20/10), florfenicol (FFC30), gentamicina (GM10), cloranfenicol (C30), trimetoprim/sulfametoxazol (STX25), kanamicina (K30), norfloxacin (NOR10), ciprofloxacino (CIP5), cefalotina (CF30), cefalexina (CL30), cefuroxime (CM30), cefoxitin (FOX30), cefotaxime (CTX30), ceftazidime (CAZ30) y cefepime (FEP30). Para establecer la respuesta bacteriana al antibiótico se midieron los halos que indican la zona de inhibición del crecimiento, interpretando de acuerdo con los patrones estándar de diámetro de halo de inhibición para cada antibiótico del CLSI, y teniendo como cepa de referencia la *E. coli* ATCC 25922.

Para confirmar la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEES) en las cepas sospechosas se realizó la prueba del doble disco. Para esto, en una placa de

agar Muller-Hinton se inocula el microorganismo sospechoso con una turbidez estandarizada (McFarland 0.5), se aplican sensidiscos de ácido clavulánico o de amoxicilina/clavulánico y de dos cefalosporinas de tercera generación a una distancia de 20-30 mm de centro a centro. Se utilizaron los discos de amoxicilina/ácido clavulánico, junto a cefotaxime 30 µg (CTX) y ceftazidime 30 µg (CAZ) (Laube *et al.*, 2013). Se incubaron durante 18 horas a 37 °C, donde una prueba positiva para BLEE muestra aumento del halo de inhibición en las zonas donde el disco de ácido clavulánico está cercano a la cefalosporina.

RESULTADOS

Los perfiles de susceptibilidad de las 46 cepas aisladas se muestran en la Figura 1. El 46% de las 100 muestras fueron positivas para aislamiento de *E. coli*, mientras que 5% resultaron ser del género *Klebsiella*. En el caso

de las cepas de *E. coli* se observó resistencia a los antibióticos betalactámicos (91%), cefalosporinas de primera generación (100%), segunda (96%), tercera (82%) y cuarta generación (84%), aminoglucosidos (43%), quinolonas (54%) y sulfonamidas (70%). Así mismo, al evaluar estas cepas con la asociación de estos antibióticos con inhibidores de betalactamasas como ampicilina sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico, disminuyó el porcentaje de resistencia al 26% (Figura 1). La prueba del doble disco confirmó la presencia de BLEES en el 63% de las cepas obtenidas de las bolsas de Fabricio.

DISCUSIÓN

A medida que aumenta la exigencia sobre una producción avícola más eficiente, se buscan nuevos métodos para optimizar el recurso genético, optimizar la absorción de los nutrientes y controlar los agentes patógenos. Pese a que en países como Colombia, Argentina y Perú está restringida la comercialización de antibióticos como el cloranfenicol, olaquinox, nitroimidazoles y nitrofuranos para uso en animales destinados al consumo humano (Quesada *et al.*, 2016), algunos antibióticos se siguen utilizando como promotores de crecimiento, buscando mantener una integridad intestinal libre de bacterias patógenas. Estas situaciones han generado que algunas cepas de *E. coli* presentes en la microbiota normal del intestino y ciego de las aves generen resistencia a los antibióticos (Díaz-López *et al.*, 2017).

El estudio evidenció una elevada prevalencia de colonización de pollos por cepas de *E. coli* con fenotipo BLEE, similares a los obtenidos en Brasil en los que identificaron resistencia a más de tres grupos de antibióticos (Bezerra *et al.*, 2016). En trabajos realizados en Cuba se encontró el 93.3% de multirresistencia los antimicrobianos evaluados (Hernández-Fillor *et al.*, 2017). En forma similar, Mainali *et al.* (2013) encontra-

ron en Canadá 79.2% de resistencia a uno o más de los antibióticos evaluados, donde el 54.3% fueron resistentes a tres o más antimicrobianos y el 10.8% fueron resistentes a cinco o más antimicrobianos.

En el presente estudio se evidenció el 100% de resistencia a las cefalosporinas de primera generación, hecho que pudiera estar relacionado con el uso de betalactámicos, unido a fallas en manejo al que se ven sometidos con frecuencia los animales (densidades altas, cambios en la temperatura ambiental, tratamientos de agua inadecuados, entre otros). Este tipo de situaciones facilita tanto el intercambio de bacterias entre individuos como el intercambio de genes de resistencia entre bacterias, hecho que probablemente puede ser transferido al humano mediante el consumo de carne de pollo (Abreu *et al.*, 2013). Cota-Rubio *et al.* (2014) analizaron casos de aislamientos en animales de granja dispuestos para consumo humano entre 2010 y 2012, donde fue evidente que el uso indiscriminado de los antibióticos ha repercutido en la presencia de cepas bacterianas a antibióticos, tales como betalactámicos, macrólidos, glucopéptidos, aminoglucosidos, quinolonas, tetraciclinas y sulfamidas, en los que predomina la resistencia al grupo de los betalactámicos.

CONCLUSIONES

- El 91% de las cepas fueron resistentes a la ampicilina y el 80% a las cefalosporinas
- La prueba del doble disco confirmó la presencia de BLEES en el 63% de las cepas obtenidas de las bolsas de Fabricio.

Agradecimientos

Los investigadores expresan su agradecimiento a la granja avícola de Lebrija, a la Universidad de Santander (UDES), a la Universidad de Boyacá y a todas las personas

que contribuyeron de una u otra forma a la realización de este estudio.

LITERATURA CITADA

1. **Abreu R, Castro-Hernández B, Madueño A, Espigares-Rodríguez E, Moreno-Roldán E, Moreno P, Sánchez-Tudela JM, et al. 2013.** Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en pollos de granjas avícolas de la isla de Tenerife (España). *Higiene y Sanidad Ambiental* 13: 1091-1096.
2. **Alonso MZ, Krüger A, Sanz ME, Padola NL, Lucchesi PM. 2016.** Serotypes, virulence profiles and stx subtypes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from chicken derived products. *Rev Argent Microbiol* 48: 325-328. doi: 10.1016/j.ram.2016.04.009
3. **Alonso MZ, Sanz ME, Padola NL, Lucchesi PM. 2014.** Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) aisladas durante el proceso de faena de pollos. *Rev Argent Microbiol* 46: 122-125.
4. **Amin U, Kamil SA, Shah SA, Dar TA, Mir MS, Ali R, Wani BM. 2017.** Serotyping and prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* infection in broilers in Kashmir. *Pharma Innovation Int J* 6: 336-338.
5. **Astaiza JM, Benavides CJ, Lopez MJ, Portilla JP. 2014.** Diagnóstico de los principales antibióticos recomendados para pollo de engorde (broiler) por los centros agropecuarios del municipio de Pasto, Nariño, Colombia. *Rev Med Vet* 27: 99-110.
6. **Berglund B. 2015.** Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect Ecol Epidemiol* 5: 28564. doi: 10.3402/iee.v5.28564
7. **Bezerra WG, da Silva IN, Vasconcelos R, Machado D, Lopes E, Lima SV, Teixeira RS. 2016.** Isolation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. enterica (O: 6, 8) in broiler chickens. *Acta Sci Vet* 44: 1364.
8. **Briz RC. 2006.** Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias. Universidad de Zaragoza. [Internet]. Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1142587453a.pdf
9. **Bueno D, López N, Rodríguez F, Procura F. 2016.** Producción de pollos parrilleros en países sudamericanos y planes sanitarios nacionales para el control de *Salmonella* en dichos animales. *Rev Agron Noroeste Argentino* 36: 11-37.
10. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA, USA: CLSI. 199 p.
11. **Cona E. 2002.** Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev Chil Infectol* 19: 77-81. doi: 10.4067/S0716-10182002019200001
12. **Cota-Rubio E, Hurtado-Ayala L, Pérez-Morales E, Alcántara-Jurado L. 2014.** Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *RelbCi* 1: 75-85.
13. **Díaz-López EA, Ángel-Isaza J, Ángel B. 2017.** Probiotics in poultry farming: a review. *Rev Med Vet* 35: 175-189. doi: 10.19052/mv.4400
14. **Díaz M. 2017.** Determinantes del desarrollo en la avicultura en Colombia: instituciones, organizaciones y tecnología. Banco de la República, Cartagena. [Internet]. Disponible en: http://www.banrep.gov.co/docum/Lectura_finanzas/pdf/dtser_214.pdf

15. **El-Mongy MA, Abd-El-Moneam GM, Moawad AA, Mohammed AB. 2018.** Serotyping and *Escherichia coli* isolated virulence genes detection in from broiler chickens. *J Biol Sci* 18: 46-50. doi: 10.3923/jbs.2018.46.50
16. **[FENAVI] Federación Nacional de Avicultores de Colombia. 2018.** [Internet]. Disponible en: <http://fenavi.org/estadisticas/informacion-estadistica-publica/>
17. **Hernández-Fillor RE, Báez-Arias M, Alfonso-Zamora P, Espinosa-Castaño I. 2017.** Susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelícula en aislados de *Escherichia coli* procedentes de gallinas ponedoras. *Rev Salud Animal* 39(3). [Internet]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n3/rsa05317.pdf>
18. **Laube H, Friese A, Von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. 2013.** Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Appl Environ Microb* 79: 4815-4820. doi: 10.1128/AEM.00856-13
19. **Laube H, Friese A, Von Salviati C, Guerra B, Rösler U. 2014.** Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* 172: 519-527. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.06.008
20. **Mainali C, McFall M, King R, Irwin R. 2013.** Evaluation of antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates of broiler chickens at slaughter in Alberta, Canada. *J Food Protect* 76: 2045-2051. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-203
21. **Mantilla CL, Portacio AB. 2012.** Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Rev Colomb Biotecnol* 14: 31-40.
22. **Martínez-Guardia M, Medina-Arroyo H, Bonilla-Flórez A. 2011.** Estado actual de la producción de pollos de engorde y gallinas ponedoras en el municipio de Quibdó-Chocó. *Livestock Res Rural Develop* 23(3). [Internet]. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd23/3/mart23044.htm>
23. **Mellata M, Johnson J, Curtiss R. 2018.** *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. *Zoonoses Public Hlth* 65: 103-113. doi: 10.1111/zph.12376
24. **Mitchell NM, Johnson JR, Johnston B, Curtiss R, Mellata M. 2015.** Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microb* 81: 1177-1187. doi: 10.1128/AEM.03524-14
25. **Perello MMG 2009.** Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras. Tesis Doctoral. Madrid, España: Univ. Complutense de Madrid. 184 p.
26. **Puig PY, Leyva CV, Apórtela LN, Campos GN, Frerer MY, Soto RP. 2014.** Serogroups and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated in foods from outbreaks of diarrhea. *Rev Cubana Alimentación Nutr* 24: 161-167.
27. **Quesada A, Reginatto GA, Ruiz A, Colantonio LD, Burrone MS. 2016.** Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Rev Per Med Exp Salud Pública* 33: 32-44. doi: 10.17843/rpmesp.2016.331.1899
28. **Ronco T, Stegger M, Olsen RH, Sekse C, Nordstoga AB, Pohjanvirta T, Lilje B, et al. 2017.** Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78: H4 in Nordic broiler production. *BMC Genomics* 18: 13. doi: 10.1186/s12864-016-3415-6
29. **Soto Z, Pérez L, Estrada D. 2016.** Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at Colombia. *Rev Salud Uninorte* 32: 105-122. doi: 10.14482/sun.32.1.8598

30. **Soufi L, Sáenz Y, Vinué L, Abbassi MS, Ruiz E, Zarazaga M, Ben Hassen A, et al. 2011.** *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *Int J Food Microbiol* 144: 497-502. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.008
31. **Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss R, Mellata M. 2017.** Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *Plos One* 12: e0180599. doi: 10.1371/journal.pone.0180599