



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA Y
DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN
CEPAS DE *ENTEROCOCCUS spp.* AISLADOS
EN GALLINAS REPRODUCTORAS.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

JAVIER MARCOS MARTIN
TUTORA: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER
DIRECTOR EXPERIMENTAL: ALEJANDRO FENOLLAR PENADÉS

VALENCIA, Diciembre 2020

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA Y DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN CEPAS DE *Enterococcus spp.* AISLADOS EN GALLINAS REPRODUCTORAS.

Javier Marcos Martin, Alejandro Fenollar Penadés¹ y Ana Isabel Jiménez Belenguer¹

¹ Departamento de Biotecnología. *Universitat Politècnica de Valencia.*

RESUMEN

El incremento de bacterias resistentes y multirresistentes a los antibióticos es un problema actual de salud pública. Los animales destinados al consumo humano suponen un importante reservorio de cepas resistentes capaces de transmitir genes de resistencia a bacterias potencialmente patógenas. Debido a la importancia del sector avícola en nuestro país, se ha realizado un estudio a partir de cepas de *Enterococcus spp.* aisladas de gallinas reproductoras de diferentes edades con el fin de conocer la prevalencia de las resistencias a antibióticos de interés clínico.

Se realizó una identificación de especies de *Enterococcus spp.* en gallinas, con el objetivo de ver el tipo de cepas que predominan en estos animales. Obteniendo un 79,6% *E. faecium* y un 20,4% de la especie *E. faecalis*. Posteriormente se estudió la tasa de resistencia a varios antibióticos de uso clínico. Con un resultado del 88,4% de cepas con al menos una resistencia a un antibiótico y un 13,7% de cepas resistentes a más de un antibiótico. La mayoría de las resistencias se observaron en Tetraciclinas (88%) y en Eritromicina (36%). El estudio de los perfiles de genes de resistencia *emrA* y *emrB* en aquellas cepas con resistencia a Eritromicina y Dalfopristina/Quinupristina mostró que la presencia de estos genes fue de un 83% en muestras con resistencia a Eritromicina y un 88% en muestras resistentes a Dalfopristina/Quinupristina.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se establece una elevada presencia de los géneros *E. faecalis* y *E. faecium* en la microbiota intestinal de las aves. También se ha visto un elevado número de resistencias a antibióticos que en la actualidad tienen uso clínico. Se ha establecido una posible relación entre los genes *emrA* y *emrB* a la resistencia de Eritromicina y Dalfopristina/Quinupristina.

RESUM

L'increment de bacteries resistents i multirresistents al antibiòtics es un problema de salut pública. Els animals destinats a la alimentació humana suposen un important reservori de ceps resistents amb capacitat de transmetre gens de resistència a bacteries potencialment patògenes. Per la importància del sector avícola, se ha realitzat un estudi partint de ceps de *Enterococcus spp.* aïllades de gallines reproductores de diferents edats amb la finalitat de conèixer la prevalença de les resistències a antibiòtics d'interès clínic.

Amb l'objectiu de veure el tipus de ceps que predominen en estos animals. Obtenint un 79,6% *E. faecium* i un 20,4% de la especie *E. faecalis*. Posteriorment es va estudiar la tasa de resistencia a diversos antibiòtics d'ús clínic. Amb un

resultat de 88,4% de cepes amb al menys una resistència a un antibiòtic i un 13,7% de cepes resistents a més d'un antibiòtic. La majoria de les resistències es van observar en Tetraciclins (88%) i en Eritromicina (36%). L'estudi dels perfils de gens de resistència *emrA* i *emrB* en aquelles cepes amb resistència a Eritromicina y Dalfopristina/Quinupristina va mostrar que la presència de estos gens va ser d'un 83% en les mostres con resistència a Eritromicina i d'un 88% en mostres con resistència a Dalfopristina/Quinupristina.

Amb aquests resultats obtinguts en aquest treball se estableix una elevada presència del gèneres *E. faecalis* y *E. faecium* a la microbiota intestinal de les aus. També s'ha vist un elevat nombre de resistències a antibiòtics que en la actualitat tenen un ús clínic. S'ha establert una possible relació entre el gens *emrA* i *emrB* a la resistència de Eritromicina i Dalfopristina/Quinupristina.

ABSTRACT

The growth of antibiotic resistant and multiresistant bacteria is a current public health problem. Animals destined for human consumption represent an important reservoir of resistant strains capable of transmitting resistance genes to potentially pathogenic bacteria. Due to the importance of the poultry sector, a study has been carried out using strains of *Enterococcus spp.* isolated from breeding hens of different ages in order to determine the prevalence of antibiotic resistance of clinical interest.

It was done a species identification in *Enterococcus spp.* in broilers. In order to see the type of strains that predominate in these animals. Obtaining 79,6% *E. faecium* and 20,4% *E. faecalis*. Subsequently, the resistance rate to various antibiotics clinical use was studied. With a result of 88,4% of strains with at least one resistance to one antibiotic and 13,7% of strains resistant to more than one antibiotic. Most of the resistances were observed in Tetracyclines (88%) and in Erythromycin (36%). The study of the profiles of resistance genes *emrA* and *emrB* in those strains with resistance to Erythromycin and Dalfopristin/Quinupristin showed that the presence of these genes was 83% in samples with resistance to Erythromycin and 88% in samples resistant to Dalfopristin/Quinupristin.

With the results obtained in this work, a high presence of the genera *E. faecalis* and *E. faecium* is established in the intestinal microbiota of broilers. Has also been seen a high number of resistances to antibiotics that are currently in clinical use. A possible relationship between the *emrA* and *emrB* genes to Erythromycin and Dalfopristin/Quinupristin resistance has been established.

Palabras clave: *Multiresistencias, Industria Avícola, Enterococcus spp., Antibiograma, PCR*

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como en animal. Uno de los mecanismos de adquisición de la resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Estas bacterias farmacorresistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes al no disponer de fármacos que las erradiquen.

La OMS advierte que la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia, la gonorrea o las enfermedades de transmisión alimentaria, son cada vez más difíciles e incluso imposibles de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia (OMS, 2020).

El uso generalizado de antibióticos en seres humanos y animales contribuye a este problema. Los antibióticos utilizados en animales productores de alimentos están estrechamente relacionados con los utilizados en la medicina humana y pueden seleccionar resistencia en estos animales. La transmisión entre especies de bacterias resistentes o elementos genéticos resistentes de animales a humanos puede ocurrir y ocurre (Tang et al., 2017).

El uso rutinario de los antibióticos en el alimento de animales destinados para el consumo humano ha contribuido a incrementar la generación de bacterias resistentes lo que conlleva a un problema mayor de salud pública (Cota et al., 2014), desde 2006 se establece la prohibición de la Unión Europea en el uso preventivo de antimicrobianos en piensos medicamentosos (Reglamento (UE) 2019/6) para minimizar su impacto en Salud Pública. Otro factor que favorece a la propagación de enfermedades infecciosas es el uso de métodos de producción intensivo en el que los animales están hacinados en espacios muy reducidos (Silbergeld et al., 2008).

Para abastecer el incremento en la demanda de productos de origen animal en la Comunidad Valenciana a un precio asequible se implementa la ganadería intensiva industrializada, basada en el criado de un elevado número de animales en espacios reducidos. Uno de los sectores más afectados por este tipo de producción animal es el avícola (Instituto de ciencia y tecnología animal, 2010).

La Autoridad Europea de la Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de enfermedades (ECDC) publicó un informe en 2012 sobre resistencia antimicrobiana a las bacterias zoonóticas que afectan a seres humanos, animales y alimentos. La resistencia para el indicador *Escherichia coli* en aves de corral era alta a la ciprofloxacina, antimicrobiano de importancia crítica, mientras que, para el microorganismo indicador en animales *Enterococcus*, se registró alta resistencia de los animales a otro antibiótico importante, la eritromicina (AECOSAN, 2012).

En los últimos años el género *Enterococcus* ha cobrado una gran importancia al nivel internacional por la adquisición de resistencia a muchos antimicrobianos.

De igual manera, son considerados indicadores de la inocuidad de los alimentos, pues debido a su amplia distribución, pueden encontrarse en estos productos y sobrevivir a los procesos de tratamiento a que son sometidos, por su elevada resistencia a condiciones adversas (Díaz et al., 2010).

Los enterococos se consideran microorganismos integrantes de la microbiota intestinal del hombre y otros animales. Las especies más frecuentes en el intestino humano son *E. faecalis* y *E. faecium*. La proporción de éstas varía dependiendo de la región geográfica, lo que hace suponer la influencia de la dieta y de otros factores ambientales en la presencia de tales microorganismos en el intestino (Abriouel, et al., 2008). En el ámbito hospitalario la presencia de brotes de *E. faecalis* representa entre 60% y 90% de los aislamientos clínicos de enterococos. Mientras que *E. faecium* en la segunda especie aislada con mayor frecuencia, representando el 5% al 16% de los aislamientos clínicos (Silvia, I., 2005).

En el sector alimentario la presencia de enterococos se da con frecuencia en el producto terminado. En el caso de productos cárnicos la contaminación tiene origen fecal y se produce durante el sacrificio (Foulquié Moreno, et al., 2006). En muestras fecales provenientes de aves, las especies de *E. faecalis* y *E. faecium* son predominantes (Ledesma, et al., 2015).

Enterococcus se caracteriza por presentar resistencia intrínseca de grado variable a un gran número de antibióticos, y pueden adquirir nuevas resistencias con una gran facilidad. Son comunes las resistencias adquiridas a cloranfenicol, eritromicina, a altos niveles de aminoglicósidos y a tetraciclinas. La resistencia a antibióticos es un factor clave para la prevalencia de los de los *Enterococcus* en las infecciones nosocomiales, ya que dificultan su erradicación. Así mismo, los enterococos pueden contribuir a la diseminación de genes de resistencia fuera del ámbito hospitalario, lo que tiene una especial importancia en alimentos (Abriouel, et al., 2008).

Debido a la creciente preocupación generada por el incremento de las resistencias en *Enterococcus spp.* a distintos antibióticos y su potencial diseminación a otros microorganismos presentes en la microbiota intestinal con el consiguiente riesgo de salud pública se planteó este trabajo que tiene como objetivo el estudio y la caracterización de las resistencias antimicrobianas en cepas de *Enterococcus spp.* aisladas de gallinas reproductoras como potenciales transmisores de las resistencias a los pollos de consumo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El estudio se realizó durante los meses de junio a diciembre de 2017, los lotes obtenidos fueron de dos granjas de gallinas reproductoras. Las gallinas del lote A al inicio de estudio tenían 1 día de vida y al final del estudio 28 semanas. En el caso de las gallinas del lote B, la edad al inicio del muestreo fue de 27 semanas y al final de 54 semanas. Las muestras se comprendieron de meconios (solo en el primer muestreo del lote A) y de heces y calzas (en ambos lotes). El muestreo del estudio abarcó un total de 328 muestras distribuidas según la tabla 1.

En el muestreo A se tomaron cinco muestras, la primera de ella tras 24 horas de su nacimiento, las dos siguientes a las 4 y 19 semanas y las últimas dos a las 25 y 28 semanas donde las gallinas eran adultas. Las muestras se codificaron en orden cronológico desde M1 a M5, siendo M1 el primer muestreo. De las muestras se seleccionaron 15 cepas de cada uno a excepción de M1 que fueron 30.

TABLA 1. Muestreo de las gallinas por lotes y origen de las cepas.

Lote	Muestreo	Muestra	Edad (días)	N ° Cepas
A	M1	Meconios	1	30
	M2	Heces	28	15
		Calzas	28	15
	M3	Heces	76	15
		Calzas	76	15
	M4	Heces	175	15
		Calzas	175	15
	M5	Heces	196	15
		Calzas	196	15
	B	M1	Heces	189
Calzas			189	10
M2		Heces	210	10
		Calzas	210	10
M3		Heces	231	10
		Calzas	231	10
M4		Heces	252	10
M5		Heces	273	10
M6		Heces	294	10
		Calzas	294	10
M7		Heces	315	10
		Calzas	315	10
M8		Heces	336	10
		Calzas	336	10
M9		Heces	357	10
		Calzas	357	10
M10		Heces	378	10
		Calzas	378	10

Para el muestreo B se tomaron 10 muestras, la primera de ellas en gallinas adultas de 27 semanas, este muestreo se repetiría cada tres semanas hasta el último muestreo con las gallinas adultas de 54 semanas. Las muestras se codificaron en orden cronológico desde M1 a M10, siendo M1 el primer muestreo. De cada muestra se seleccionaron 10 cepas. En el caso de las M3 y M4 no se realizaron pruebas de calzas y en el muestreo M1 de heces solo hubo 8 muestras.

Tras la toma de muestras llevadas a cabo por el veterinario de la granja las muestras fueron trasladadas hasta la Universitat Politècnica de València a 4°C. Una vez recibidas las muestras en el laboratorio se conservaron a 4°C durante 24 horas hasta su análisis.

Tratamiento de muestras

Para las muestras de heces y meconios se pesaron 25 gramos y se añadieron 225 gramos de agua de peptona (Buffered Peptone Water (ISO), Sharlau, Barcelona, España) obteniendo la disolución 1:10. En el caso de las muestras de calzas se ajustó la cantidad de agua de peptona hasta llegar a la dilución 1:10. A partir de esta primera dilución se realizaron diluciones decimales seriadas con agua destilada.

Aislamiento e identificación de *Enterococcus spp.*

Se realizó el aislamiento de *Enterococcus spp.* y su identificación se llevó a cabo mediante UNE ISO 7899-2, pero con una dilución inicial de la muestra. A partir de las diluciones decimales seriadas se sembraron en el medio selectivo para enterococos Slanetz & Bartley (Slanetz Bartley Agar, Sharlau, Barcelona, España) mediante triple estría con el objetivo de obtener colonias aisladas. Se incubaron a 37°C durante 48 horas. A partir de este cultivo, se seleccionaron aleatoriamente 15 colonias típicas de *Enterococcus spp.* para las muestras provenientes del lote A y 10 colonias provenientes del lote B. Las colonias seleccionadas se cultivaron en medio de agar caldo infusión cerebro corazón (BHIA) (Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth), Sharlau, Barcelona, España; Agar Agar powder, for bacteriology, Scharlau, Barcelona, España) y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Para la identificación de *Enterococcus spp.* se sometieron las colonias sospechosas a partir del cultivo en BHIA a la prueba de hidrólisis de la Esculina, realizando una estría sobre el medio Agar Esculina (Kanamycin esculin azide agar, Scharlau, Barcelona, España) y se incubaron a 42°C durante 2-4 horas. Todas aquellas colonias que produjeron un ennegrecimiento del medio por la aparición de sales insolubles de hierro resultante de la hidrólisis de la esculina se consideraron positivas. Todas las colonias positivas de dicho análisis se consideraron *Enterococcus spp.*

Conservación de las muestras.

Una vez aisladas las cepas, se realizó un cultivo en agar caldo infusión cerebro corazón (BHIA) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se seleccionaron dos/tres colonias y se conservaron a -21°C en crioviales Pro-lab Diagnostics Microbank TM para posteriores análisis.

Extracción de DNA e identificación molecular de *E. faecalis* y *E. faecium*.

Se llevó a cabo la PCR de identificación de *E. faecalis* y de *E. faecium* para todas las cepas aisladas. Para la extracción del DNA se empleó el kit comercial Sigma-Aldrich (GenElute Bacterial Genomic DNA kit, USA) y se siguieron las indicaciones del fabricante.

Las condiciones empleadas para la PCR de identificación de especies fueron las descritas por Depardieu et al. (2004) tal y como se muestra en la tabla 2. Estas condiciones fueron las siguientes, 2.5 µl de NH₄ Búffer (NH₄ reaction buffer, Biotaqtm Dna Polymerase Biotline), 1.5µl MgCl₂ a concentración 1.5mM (MgCl Solution, Biotaqtm Biotline), 0.2 µl primers *E. faecalis* y *E. faecium* (Roche diagnostics, Tib-molbiol, Berlín) en fase normal y fase reversa a concentración 0.4 µM como se observa en la tabla 2, 0.2 µl de dNTP's (dNTP Mix 100mM).

Bioline) a concentración 200mM/nucleótido y 1,25U Taq polimerasa (Biotaqtm Dna Polymerase Bioline) Para un volumen total de 25 µl.

La reacción PCR se llevó a cabo mediante el termociclador (Mastercycler ep gradient S, Eppendorf). Los ciclos fueron: un primer ciclo a 94°C durante 3 min, 30 ciclos que constaron de las siguientes etapas: 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min, 72°C durante 1 min y una extensión final de 7 min a 72°C.

TABLA 2. Primers empleados en la identificación molecular de *E. faecalis* y *E. faecium*

Primer	Secuencia	Escala(µmol)	Referencia
<i>E. faecalis</i> (F)	CACCTGAAGAAACAGGC	0.4	<i>Depardieu et al. 2004</i>
<i>E. faecalis</i> (R)	ATGGCTACTTCAATTCACG	0.4	<i>Depardieu et al. 2004</i>
<i>E. faecium</i> (F)	GAGTAAATCACTGAACGA	0.4	<i>Depardieu et al. 2004</i>
<i>E. faecium</i> (R)	CGCTGATGGTATCGATTCAT	0.4	<i>Depardieu et al. 2004</i>

La lectura de los resultados de la PCR se realizó mediante eletroforesis convencional en gel Agarosa a 1,2% (Agarose D1 LOW EEO, Pronadisa) a pH 8.3 y 100bp. Utilizando Redsafe 5% (Redsafe, intRON Biotechnology) como marcador fluorescente ultravioleta. Por un periodo de 1 hora a 100V.

Estudio de las resistencias antibióticas

Una vez identificadas las cepas a nivel de especie, se realizaron los antibiogramas mediante la técnica de disco-placa (CLSI, 2014) en medio Muller-Hinton (Muller-Hinton Broth, Sharlau, Barcelona. España). Se seleccionaron los antibióticos en base a las indicaciones de EFSA (2008) para la monitorización de resistencias a antibióticos en cepas comensales aisladas de animales. Se utilizaron los siguientes discos de antibióticos a las concentraciones de antibiótico que se detallan: Eritromicina (E) 15µg, Vancomicina (VA) 30µg, Gentamicina (CN) 120µg, Estreptomina (S) 300µg, Dalfopristina/Quinupristina (QD) 15µg, Ampicina (AMP) 10 µg, Tetraciclina (TE) 30µg, Cloranfenicol (C) 30µg, Ciprofloxacina (CIP) 5µg, (Antimicrobial Susceptibility Test Disc, OXOID). Se incubaron las placas a 37°C durante 24h.

Una vez las placas incubadas, se midieron los halos de cada antibiótico y según los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) se interpretaron los resultados, pudiendo ser cepas resistentes, intermedias o sensibles.

Identificación de genes de resistencia

Para la PCR de detección de genes de resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B (MLS) *ermA* y *ermB* se emplearon las cepas que resultaron ser resistentes a Eritromicina y a Dalfopristina/Quinupristina. La búsqueda de los genes de resistencia *ermA* y *ermB* es debido a que es el

mecanismo más frecuente que confiere resistencia a los MLS (Ardanuy, et. al., 2011).

Las condiciones empleadas para la PCR de *emrA* se seleccionaron en base al artículo de *Chen et al. (2007)* que se muestran en la tabla 3. Las PCR se realizaron en un volumen final de 25µl con la siguiente concentración de los reactivos: 1x NH₄ reaction buffer (Biotaqtm Dna Polymerase Bioline), 2.5mM MgCl₂ (MgCl Solution, Biotaqtm Bioline), 0.25 µl primers *emrA* (Roche diagnostics, Tib-molbiol. Berlín) en fase normal y fase reversa a concentración 0.3 µl, 0.5mM µl de dNTP's (DNTP Mix 100mM. Bioline) y 1.25U Taqpolimerasa (Biotaqtm Dna Polymerase Bioline). Las temperaturas del termociclador (Mastercycler ep gradient S, Eppendorf) fueron de 94°C durante 4min, 30 ciclos de 94°C/30s, 55°C/30s y 72°C/45s y la extensión final de 7 min a 72°C.

TABLA 3. Primers empleados en la detección de los genes de resistencia a Eritromicina y Dalfopristina/Quinupristina.

Primer	Secuencia	Escala(µmol)	Referencia
ermA (F)	GAAATYGGRTCAGGAAAAGG	0.01	<i>Chen et al. 2007</i>
ermA (R)	AAYAGYAAACCYAAAGCTC	0.01	<i>Chen et al. 2007</i>
ermB (F)	GATACCGTTTACGAAATTGG	0.01	<i>Depardieu et al. 2004</i>
ermB (R)	GAATCGAGACTTGAGTGTGC	0.01	<i>Depardieu et al. 2004</i>

Las condiciones para la PCR *emrB* fueron las descritas por *Depardieu et al. (2004)* (tabla 3) exceptuando la concentración de los primers *emrB* que se ajustó a 0.01µmol obteniéndose resultados más claros. Así mismo se modificó las condiciones del termociclador que de un 1 ciclo inicial a 94°C durante 4min, 30 ciclos de 94°C durante 30s, 58°C durante 30s y 72°C durante 45s y la extensión final de 7 min a 72°C.

La lectura de los resultados se realizó mediante eletroforesis convencional en gel Agarosa a 1,2% (Agarose D1 LOW EEO, Pronadisa) a pH 8.3 y 100bp. Utilizando Redsafe 5% (Redsafe, intRON Biotechnology) como marcador fluorescente ultravioleta. Por un periodo de 1 hora a 100V.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron un total de 328 cepas de *Enterococcus spp.*, de las cuáles, 150 pertenecieron al lote A y 178 al lote B. En cuanto al origen de muestras de las cuáles procedían se obtuvieron 30 cepas de meconios (todas del lote A), 158 cepas de heces (60 del lote A y 98 del lote B) y 140 cepas de calzas (60 del lote A y 80 del lote B).

Identificación de especies

Una vez se realizó la identificación mediante PCR se obtuvo como resultado que todas las cepas estudiadas pertenecían a las dos especies de enterococos, tal y cómo se muestra en la figura 1. La especie predominante fue *E. faecium* con 261 cepas (79,6% del total) mientras que la especie *E. faecalis* se identificó

en 67 cepas (20,4%). Los resultados obtenidos fueron similares al estudio de Ballesteros *et al.* (2004), en el cual el 90% de las muestras pertenecían a las especies *E. faecalis* y *E. faecium*. Aunque hay una diferenciación en el porcentaje de cada una de las especies, siendo el 77,1% de las muestras analizadas de la especie *E. faecalis* y el 13,3% de la especie *E. faecium*.

Tras los resultados obtenidos se observó una gran diferencia entre los distintos porcentajes de especies según el origen de las muestras como se observa en la figura 1. La única especie aislada de las muestras de meconios fue *E. faecalis*, siendo el 100% de las muestras. En el caso de las pollitas (4-19 semanas) fue un 20% *E. faecalis* frente a un 80% de *E. faecium*. Mientras que para ambos lotes y todos los tipos de muestras de gallinas adultas hubo un cambio en el porcentaje, predominando *E. faecium* (89,5%). Este cambio podría deberse a la utilización de cepas de *E. faecium* como probiótico, ya que estudios como Chavez, et al. (2016) y Díaz et al. (2017) lo consideran como un promotor del crecimiento en el sector avícola ya que evita la proliferación de microorganismos perjudiciales para las aves en su intestino siendo su uso muy extendidos.

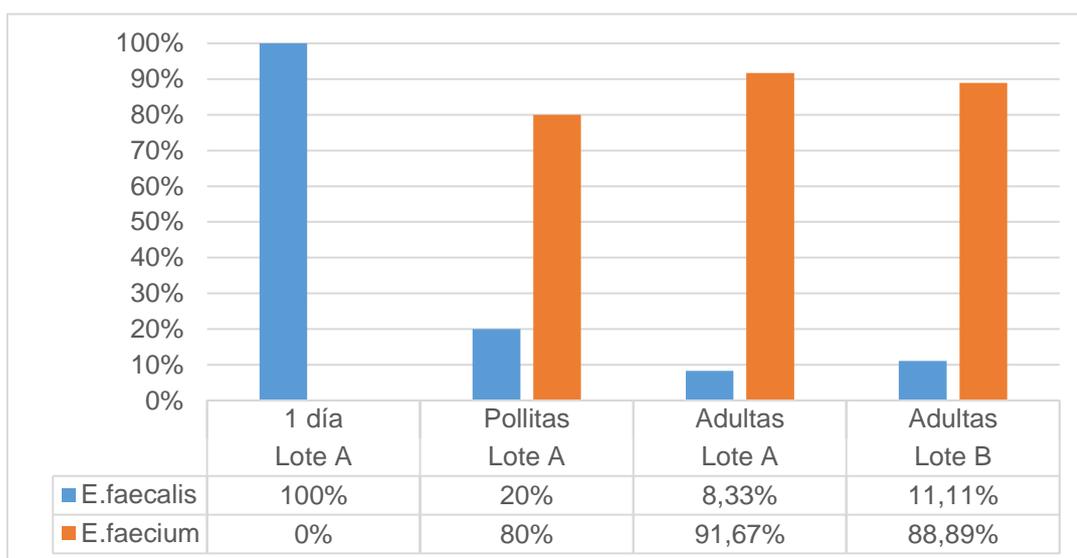


FIGURA 1. Porcentaje de cepas *E. faecalis* y *E. faecium* en los distintos tipos de muestras.

Resistencias antibióticas

En el estudio que se realizó entre las resistencias de las 328 cepas aisladas a los nueve antibióticos utilizados, los resultados fueron de 245 (74,7 %) cepas resistentes a un antibiótico, 45 (13,7%) cepas multirresistentes y 38 (11,6%) cepas sensibles a todos los antibióticos.

Los resultados en *E. faecalis* fueron de 15 (22,4%) cepas resistentes a un antibiótico, 35 (52,2%) cepas multirresistentes y 17 (25,4%) cepas sensibles a todos los antibióticos. Para los resultados para *E. faecium* se encontraron 155 (59,4%) cepas resistentes a un antibiótico, 85 (32,6%) cepas multirresistentes y

21 (8%) cepas sensibles a todos los antibióticos. En la figura 2, podemos observar los resultados obtenidos a las resistencias antibióticas.

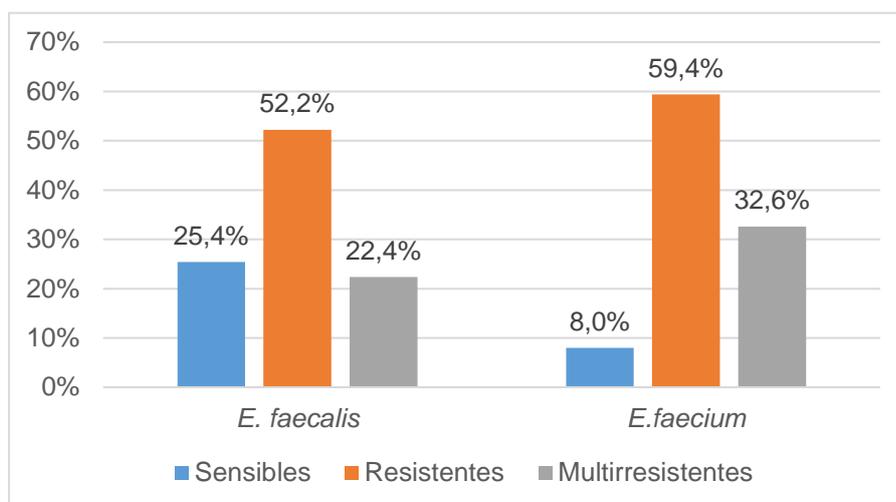


FIGURA 2. Resistencias antibióticas de las especies de *E. faecalis* y *E. faecium*.

Los resultados de las resistencias a cada antibiótico se reflejan en la tabla 4, dónde se observan las diferencias en los porcentajes según el antibiótico estudiado.

TABLA 4. Porcentajes de resistencias en antibióticos.

Antibiótico	E	QD	APM	TE	C	CIP	VA	CN	S
Nº cepas	117	43	1	287	28	35	0	0	0
%	36	13	0,3	88	9	11	0	0	0

En los antibióticos de Eritromicina y Tetraciclinas el porcentaje es muy elevado al igual que el estudio de resistencias en aves de Alcalá (2018), donde el resultado es de un 49% y 57% respectivamente.

La ausencia de cepas resistentes a Vancomicina se debe a que no está asociada dicha resistencia al sector avícola ya que las cepas resistentes encontradas en animales datan de los años 90 y se asociaron al uso de un promotor del crecimiento animal llamado avoparcina que se prohibió en el año 1997 en la Unión Europea (Fariñas y Torres, 2007). En el estudio de Lapierre et. al. (2010) de un total de 96 muestras de heces en aves se obtuvieron todas las cepas de enterococos sensibles a Vancomicina. Con lo que concluimos que los resultados obtenidos en nuestro estudio son los esperados por el origen de las muestras y las especies de las cepas.

La función de los Macrólidos como la Eritromicina y las Estreptograminas como la Dalfopristina/Quinupristina actúan sobre el ribosoma de la bacteria inhibiendo la síntesis de proteínas. El gen *emrB* codifica una enzima que disminuye dicha unión confiriendo resistencia a este tipo de antibióticos (Carrilero, 2017). También en el estudio de Abriouel, et al. (2008) asocia el gen *emrA* a la resistencia de antibióticos a través del mismo mecanismo.

En la lectura de resultados observamos una ausencia de especies con resistencia a estreptomocina. Debido a la ausencia de tratamientos con este antibiótico destinados para aves, como se puede comprobar en la agencia española de medicamentos y productos sanitarios.

Como en el estudio de Lapierre et. al. (2010) se obtuvo ausencia de muestras resistentes a Gentamicina debido al escaso uso de este antibiótico en aves.

Prevalencia de resistencias antibióticas entre especies

Para un segundo estudio sobre las resistencias antibióticas se relacionaron el tipo de muestras y los distintos lotes, pero se observó que no había diferencia significativa entre ambos y que una comparativa entre muestras con una gran diferencia en las especies de cepas no aportaba información de importancia. Por lo tanto, la siguiente comparación de las resistencias a antibióticos que se llevó a cabo fue en base al tipo de especie como se puede observar en la figura 3.

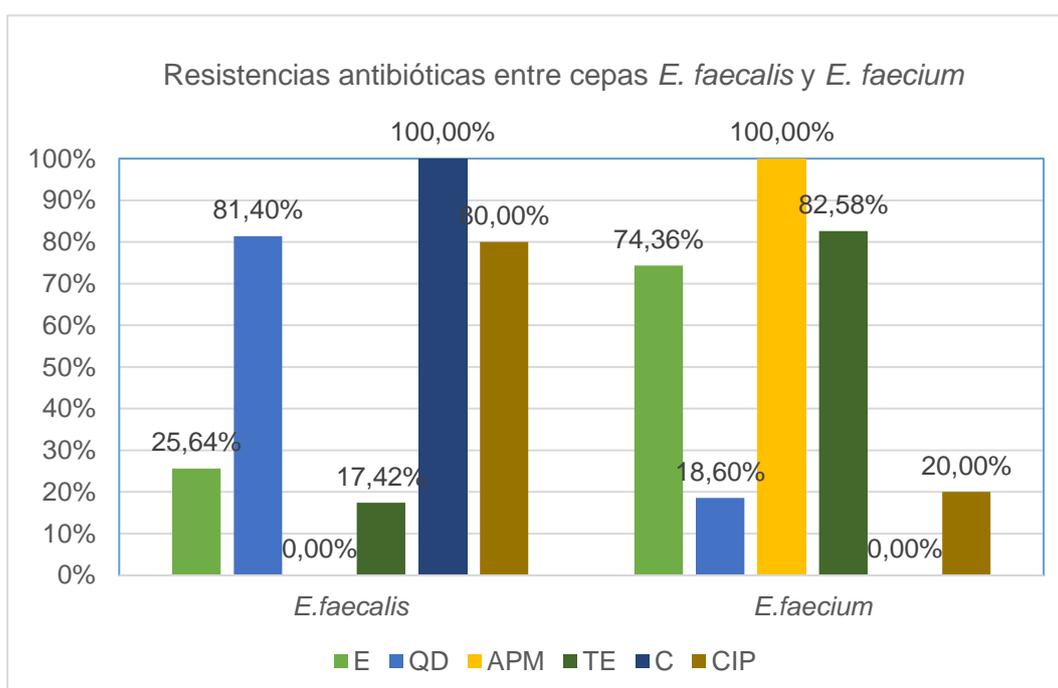


FIGURA 3. Prevalencias entre cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*

Tras los resultados se observa que el 100% de las resistencias a AMP fueron muestras de la especie *E. faecium*, al igual que en el estudio clínico de Sánchez et, al. (2004), dónde hubo diferencias significativas en las resistencias entre especies, 1% en *E. faecalis* y de un 67% en *E. faecium*.

Por otro lado, el 100% de las resistencias a C fueron de la especie *E. faecalis*.

El porcentaje de cepas total resistentes a Eritromicina fue de un 36%. Según el origen de las muestras fue de un 50% en meconios, 36% en heces y un 33% en calzas. Mientras que, según la especie, el porcentaje de resistencia fue de un 45% en *E. faecalis* y un 33% en *E. faecium*.

El porcentaje de cepas resistentes a Dalfopristina/Quinupristina según el origen de las muestras fue de un 50% en meconios, 7% en heces y un 11% en

calzas. Mientras que, según la especie, el porcentaje de resistencia fueron de un 52% en *E. faecalis* y un 3% en *E. faecium*. En estos resultados la diferencia con el estudio de Alcalá 2018 es significativa ya que se obtuvo un 65,7% de resistencia en *E. faecium*, esta gran diferenciación puede ser consecuencia de la alimentación de nuestras aves de cría frente a las aves en libertad.

Perfiles de resistencias antibióticas

Con el objetivo de conocer las resistencias desde otro punto de vista y en base al artículo Magiorakos (2012), clasificamos las cepas en base a resistencias obtenidas de los diferentes antibióticos. A través de los datos obtenidos se pudo concluir que el tipo de muestra no afecta a la prevalencia de las cepas a los antibióticos estudiados. En cambio, la especie de cada cepa estudiada es un factor de relevancia. Por lo que los perfiles de resistencias se llevaron a cabo para cada lote por la especie de la cepa ya sea *E. faecalis* o *E. faecium* como se observa en la tabla 5.

TABLA 5. Perfiles de resistencia de *E. faecalis* y *E. faecium*.

Perfiles	Lote A				Lote B			
	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
E	28	8,5	60	18,3	2	0,6	27	8,2
TE	37	11,3	98	29,9	13	4	139	42,4
E-TE	28	8,5	58	17,7	2	0,6	26	7,9
E-AMP	0	0	1	0,3	0	0	0	0
E-QD-TE	28	8,5	7	2,1	2	0,6	1	0,3
E-TE-CIP	28	8,5	6	1,8	0	0	1	0,3
E-TE-C-CIP	28	8,5	0	0	0	0	0	0

En la tabla 5 se observa en tanto lotes como cepas que el perfil de resistencia presente similitudes tal que un gran número de muestras con perfiles de resistencia a Eritromicina y Tetraciclinas. Al igual que en el estudio de Pantozzi et. al. (2010) donde obtuvo un 73% de resistencia a Eritromicina y Tetraciclina. Estos resultados son debidos al uso de estos antibióticos utilizados como promotores del crecimiento en pequeñas dosis con el fin de controlar la microbiota intestinal de las aves y mejorar la absorción de nutrientes como hace referencia el estudio de Ardoino et. al. (2017).

Perfiles de genes de resistencia a Eritromicina

Tras obtener 117 muestras resistentes a Eritromicina se estudió la relación de dicha resistencia obtenida en las diferentes cepas y la presencia de genes de resistencia *emrA* y *emrB*.

De las 117 muestras con resistencias a Eritromicina, 97 muestras (83%) contenían al menos uno de los dos genes de resistencias estudiados y 20 (17%) no presentaba ninguno de estos genes. En comparación con el estudio Lapiere et. al. (2010) del cual tenemos un 80% de muestras resistentes a Eritromicina con presencia de genes de pares de bases iguales a *emrB* y un 3% con genes de pares de bases iguales a *emrA*.

En el caso de las 15 muestras provenientes de meconios, el 100% contenían al menos un gen de resistencia estudiado, mientras que en las muestras de heces fueron 76% (38) y en calzas 85% (44).

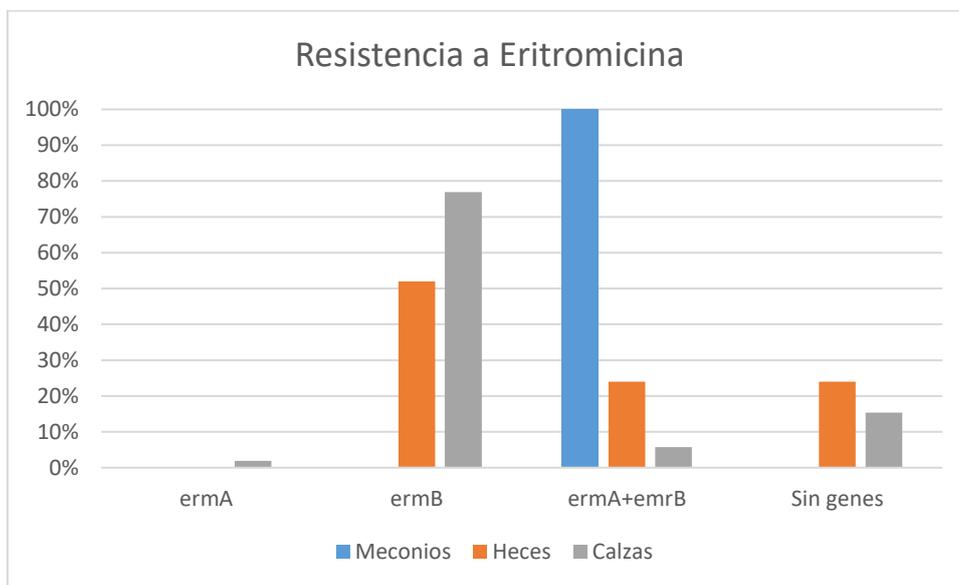


FIGURA 4. Genes resistentes a Eritromicina por tipo de muestra.

En las muestras de meconios, el 100% de los perfiles de resistencia mostraron la presencia de los genes *ermA* y *ermB*. Para las muestras de heces, un 52% de las muestras mostraron únicamente la presencia del gen *ermB* y en el 24% de las muestras se encontraban tanto el gen *ermA* como el gen *ermB*. En las muestras de calzas un 6% de las muestras se encontraban ambos genes de resistencias. Un 2% de las muestras contenían únicamente el gen *ermA* y un 77% solamente presentaban el gen *ermB*.

En las 30 cepas resistentes de la especie *E. faecalis* el 100% presentaron al menos un gen de resistencia estudiado, mientras que de las 67 cepas de *E. faecium* el porcentaje fue del 77%.

En total se obtuvo una presencia del 88% de genes *emrB* en cepas resistentes a Eritromicina en concordancia con el estudio de Felix et. al, 2018.

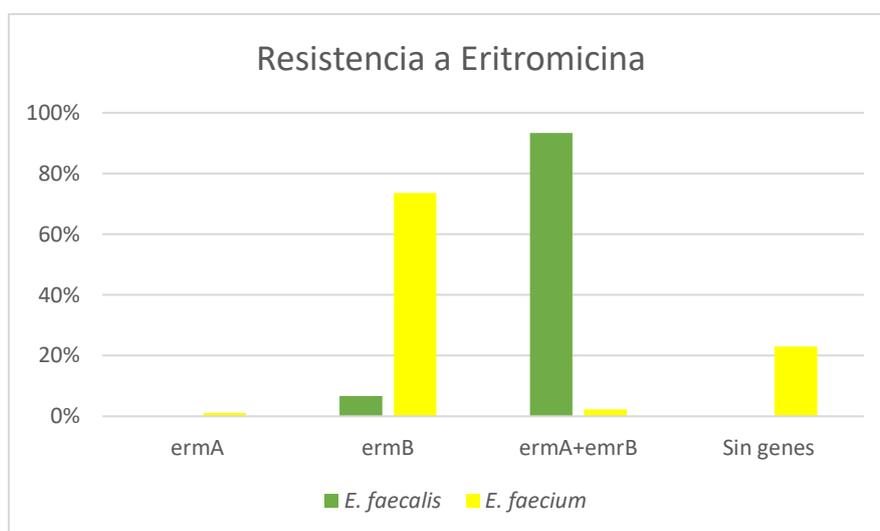


FIGURA 5. Genes resistentes a Eritromicina por cepas.

En las cepas pertenecientes a *E. faecalis*, el 93% de los perfiles de resistencia presentaron los genes *ermA* y *ermB* y el 7% contenían únicamente el gen de resistencia *ermB*. En las muestras de *E. faecium* un 2% de las muestras se encontraban ambos genes de resistencias, un 1% de las muestras contenían únicamente el gen *ermA* y un 74% solamente presentaban el gen *ermB*.

Perfiles de genes de resistencia a Dalfopristina/Quinupristina

Tras los resultados obtenidos en la resistencia a Dalfopristina/Quinupristina se procedió a estudiar la relación de dicha resistencia obtenida en las diferentes cepas y la presencia de genes de resistencia *ermA* y *ermB*.

En el total de las 43 muestras con resistencias a Dalfopristina/Quinupristina el 88% (38) contenían al menos uno de los dos genes de resistencias estudiados y el 12% no presentaba ninguno de estos genes.

En el caso de las 15 muestras provenientes de meconios el 100% de las cepas con resistencia a Dalfopristina/Quinupristina contenían al menos un gen de resistencia estudiado, en las muestras de heces el porcentaje era del 83% (8) y en calzas del 80% (8).

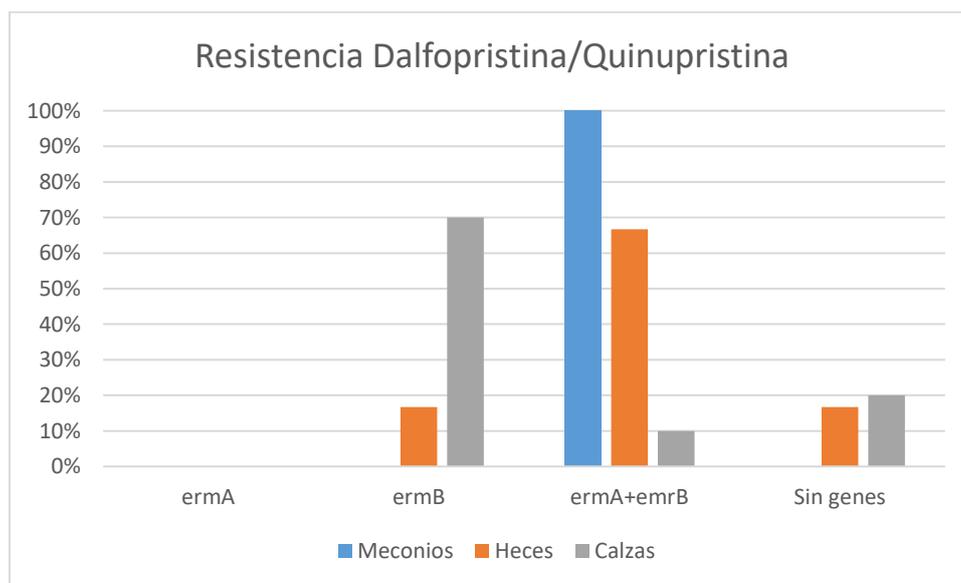


FIGURA 6. Genes resistentes a Dalfopristina/Quinupristina por tipo de muestra.

En las muestras de meconios, el 100% de los perfiles de resistencia presentaron los genes *ermA* y *ermB*. Para las muestras de heces, un 17% de las muestras contenían únicamente el gen *ermB* y en el 67% de las muestras se encontraban tanto el gen *ermA* como el gen *ermB*. En las muestras de calzas un 10% de las muestras se encontraban ambos genes de resistencias y un 70% de las muestras contenían únicamente el gen *ermB*.

En el caso de muestras resistentes de la especie *E. faecalis* el 86% presentaron al menos un gen de resistencia estudiado, en las muestras de cepas *E. faecium* el porcentaje resultó ser del 100%.

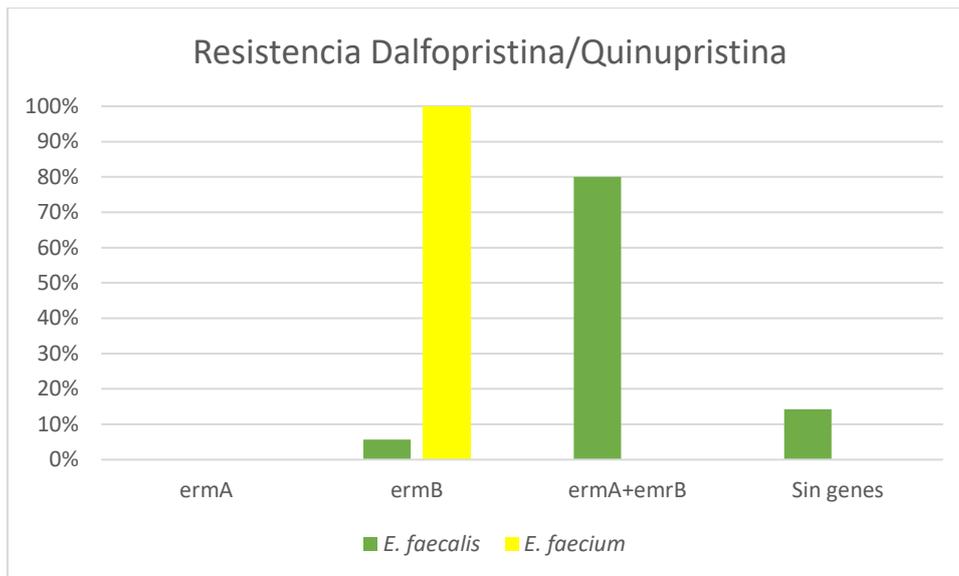


FIGURA 7. Genes resistentes a por cepas.

En las muestras de *E. faecalis*, el 80% de los perfiles de resistencia contenían los genes *ermA* y *ermB* y el 6% contenían únicamente el gen de resistencia *ermB*. En las muestras de *E. faecium* el 100% de las muestras contenían únicamente el gen *ermB*.

Este elevado número de muestras con presencia de *ermA* y/o *emrB* constata la idea de que estos genes son los responsables de la resistencia a Quinupristina/Dalfopristina como menciona el artículo Abriouel, et al., (2008).

CONCLUSIONES

La totalidad de los microorganismos aislados en los muestreos pertenecieron a las especies *E. faecalis* y *E. faecium*, que al igual que en otros estudios son las especies más comunes en aves.

Entre el tipo de muestras existió una diferencia de especies mientras que en todas las muestras provenientes de meconios la única especie que se encontró fue *E. faecalis*, mientras que en heces y calzas la especie *E. faecium* tuvo mayor presencia.

La resistencia de *Enterococcus spp.* a los antibióticos estudiados fue similar según el tipo de muestra y por lo tanto no fue una variable que afectó a los resultados obtenidos.

La resistencia de *Enterococcus spp.* a antibióticos resultó ser elevada y variable, presentando mayores resistencias a Eritromicina y Tetraciclina, mientras que mostró sensibilidad en todas las muestras estudiadas a Vancomicina, Gentamicina y Estreptomicina.

Las resistencias a antibióticos variaron según las cepas, mientras que en *E. faecium* se encontraron resistencias a Cloranfenicol, en *E. faecalis* todas las muestras fueron sensibles a dicho antibiótico.

Los perfiles de resistencia mostraron que las cepas de *Enterococcus spp.* estudiadas manifestaron multiresistencias tanto a 3 como a 4 antibióticos, además las multiresistencias se encontraron con mayor frecuencia en las muestras de Lote A que eran las pollitas de menos edad.

Los genes *ermA* y *ermB* aparecieron en un gran número de cepas resistentes a Eritromicina y Dalfopristina/Quinupristina, lo que lleva a pensar una cierta posibilidad de que estos genes confieran resistencias a estos antibióticos, lo cual supondría un riesgo de salud pública si se transmitieran a los pollos de consumo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel H., Ben Omar N., Lucas R., Gálvez A., 2008. La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, vol. 21.
- AECOSAN (2012): Informe de EFSA y de ECDC sobre resistencia antimicrobiana a las bacterias zoonóticas que afectan a seres humanos, animales y alimentos.
- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Dirección URL: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html> .[Consulta: 9 agosto. 2020].
- Alcalá L., (2018) *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* en mamíferos y aves salvajes. Diversidad de especies y resistencia a los antibióticos. Universidad de Zaragoza.
- Arduy, C., Cercenado, E., Morosini, M., Torres, C., (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos.
- Ardonio S., Toso R., Toribio M., Álvarez H., Mariani E., Cachau P., Oriani D., 2017. Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones de reemplazo. Ciencia veterinaria. Vol 19, n 1, p. 50-66
- Ballesteros C., Briones V., Goyache J., Moreno MA., 2004. Estudio y caracterización de aislados de enterococcus spp obtenidos de aves silvestres. Universidad Complutense de Madrid.
- Carrilero, L. (2017). Resistencia a Cefalosporinas en *Enterococcus spp.* Universidad Complutense de Madrid.
- Chavez LA., López A., Parra JE., 2016. El uso de *Enterococcus faecium* mejora parámetros productivos en pollos de engorde. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, vol. 63, n 2, p.113-123.
- Chen J., Yu Z., Michel F., Wittum T., Morrison M., 2007. Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in livestock manure and manure management systems. Applied and environmental microbiology, vol. 73, n. 14, p.4407-4416
- Cota E., Hurtado, L., Pérez, E., 2014. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. Universidad Autónoma de Baja California.
- Depardieu F., Perichon B., Courvalin P., 2004. Detection of the *van* alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. Journal of clinical microbiology vol. 42, n.12, p.5857-5860.

- Díaz EA., Ángel J., Ángel D., 2017. Probióticos en la avicultura: una revisión. *Revista Médica Veterinaria*. n 35, p. 175-189.
- Díaz M., Rodríguez C., Zhurbenko R., 2010. *Revista cubana de higiene y epidemiología* v.48 n2. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad.
- EFSA. (2008). Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus spp.* From food animal. *The EFSA Journal*(141), 1-44.
- Fariñas C, Torres C., 2007. Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, vol.25, n.8.
- Torres, C., Alonso C.A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., del Campo, R., & Coque, T.M. (2018). Antimicrobial resistance in *Enterococcus spp. of animal origin*. *Microbiology Spectrum*.
- Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal Food Microbiology*, vol. 106 p.1-24.
- Lapierre L., Toro C., San Martín B., 2010. Estudio de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus spp*, aisladas de aves y cerdos de producción. Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile.
- Ledesma. P., Parada RB., Vallejo M., Marguet ER., 2015. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
- Instituto de Ciencia y tecnología animal, UPV (2010). Guía de mejores técnicas disponibles para el sector de explotaciones intensivas de aves en la Comunitat Valenciana.
- Magiorakos. A., Srinivasan A., Carey R., Carmeli Y., Falagas M., Giske C., Harbath S., Hindler J., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D., Rice L., Stelling J., Struelens M., Vatopoulos A., Weber J., Monnet D., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, vol. 18.
- OMS, Organización mundial de la salud, Resistencia a los antibióticos, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos> [Consulta: 20 Junio. 2020].
- Pantozzi. F., Moredo. F., Vigo, G., Giacoboni. G., 2010. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Revista Argentina de microbiología*. Vol 42, p 49-52.
- Reglamento (UE) 2019/6 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE.
- Sánchez. M.I., Martín. D., Valladares. C., Gastañares. M.J., Torres. C., Borque. L., 2004. Sensibilidad del género *Enterococcus* a nuevos antimicrobianos. *Revista Española Quimioterapia*, Vol.17, p 184-188.
- Silbergeld, E., Graham, J., Lance, P., 2008. Industrial food animal production, Antimicrobial resistance, and human health. Johns Hopkins University. Baltimore.
- Silvia, I., 2005. Enterococos. Control de infecciones y epidemiología, Grupo Asesor.
- Tang, K., Caffrey, N., Nóbrega, D., Cork, S., Ronksley, P., Barkem, H., Polachek, A., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J., Ghali, W., 2017. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*.