



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

Escherichia coli resistente a cefalosporinas de tercera generación de aves y cerdos, reservorio para la diseminación de genes de multirresistencia

Rosa Elena Hernández Fillor ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0899-3249>

Michel Báez Áreas ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6659-0849>

Ivette Espinosa Castaño ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8932-7047>

Vincent Perreten ² <https://orcid.org/0000-0001-5722-9445>

Pastor Alfonso Zamora ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3535-010X>

Dasiel Obregón Álvarez ³ <https://orcid.org/0000-0002-1953-9706>

¹ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Mayabeque, Cuba

² Instituto de Bacteriología Veterinaria, Universidad de Berna. Berna, Suiza

³ Universidad de Guelph. Ontario, Canadá

*Autor para la correspondencia: espinosa@censa.edu.cu, ivetteespinosa763@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacteriaceae* es mediada por las enzimas β -lactamasas de espectro extendido. Las familias principales de enzimas β -lactamasas de espectro extendido son CTX-M y SHV. *E. coli* y sus genes se propagan, ya sea por diseminación clonal o transferencia horizontal a través de la cadena alimentaria. Estudios previos demostraron en Cuba tipos cefalosporinas de tercera generación CTX-M en cepas de humanos, pero no existen datos en animales. El objetivo fue caracterizar *E. coli*-cefalosporinas de tercera generación comensal en aves y cerdos sanos. **Métodos:** Se colectaron 434 exudados cloacales de aves (2013-2015) en Mayabeque y 215 rectales de cerdos en granjas y mataderos del occidente en 2016-2018. Se analizaron por técnicas de epidemiología molecular. **Resultados:** Se informa la presencia de 62 cepas de *E. coli*-RC3G en aves y 96 de cerdos. Se notificaron por primera vez en Cuba las variantes *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-15 en *E. coli* de aves y *bla*CTX-M-32, *bla*CTX-M-15 y *bla*CTX-M-55 en cepas de cerdos. Las cepas mostraron multirresistencia a otros antibióticos como tetraciclinas y fluoroquinolonas, revelaron alta diversidad, las de aves correspondieron a 23 tipos de secuencias y diferentes grupos de incompatibilidad plasmídica. Las cepas de cerdos a 16 tipos de secuencias, en una de ellas se secuenció el genoma completo y se comprobó la localización del gen *bla*CTX-M-32 en un plásmido IncX1. Coincidentemente, se detectan en cepas clínicas de humanos los tipos de secuencias 410 (aves) y 648 (cerdos) albergando *bla*CTX-M-15.

Revisores

Dianelis Quiñones Pérez
Instituto de Medicina Tropical.
La Habana, Cuba

Carlos Manuel Abeledo García
Instituto de Investigaciones Porcinas.
La Habana, Cuba

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba



Conclusiones Cepas de *E. coli* productoras de BLEE tipo CTX-M están extendidas en instalaciones de producción de aves y cerdos en la región occidental, la transferencia horizontal activa parece ser la vía principal para la diseminación de los genes *bla*CTX-M. Se sugiere revisar el uso de antimicrobianos en animales y fortalecer las buenas prácticas de higiene para minimizar el riesgo de propagación de clones de *E. coli* R-C3G.

Palabras clave: *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de 3ra generación; β -lactamasas de espectro extendido; aves; cerdos

Escherichia coli resistant to third generation cephalosporins from poultry and swine, a reservoir for the dissemination of multi-resistance genes

ABSTRACT

Introduction: Resistance to third generation cephalosporins in Enterobacteriaceae is mediated by extended spectrum β -lactamase enzymes. The main families of β -lactamase enzymes are CTX-M and SHV. *E. coli* and its genes are spread either by clonal spread or horizontal transfer through the food chain. Previous studies demonstrated in Cuba β -lactamase enzymes CTX-M types in human strains, but there are no data in animals. The objective was to characterize commensal *E. coli*- third generation cephalosporins in healthy poultry and pigs. **Methods:** Cloacal exudates (434) were collected from birds (2013-2015) in Mayabeque and 215 rectals from pigs in western farms and slaughterhouses in (2016-2015). They were analyzed by molecular epidemiology techniques. **Results:** The presence of *E. coli*- third generation cephalosporins strains is reported in birds (62) and pigs (96). The variants *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-15 were reported for the first time in Cuba in *E. coli* from birds and *bla*CTX-M-32, *bla*CTX-M-15 and *bla*CTX-M-55 in strains of pigs. The strains showed multi-resistance to other antibiotics tetracyclines and fluoroquinolones, revealed high diversity, those of birds corresponded to 23 types of sequences and different groups of plasmid incompatibility. The pig strains had 16 types of sequences, in one of them the entire genome was sequenced and the location of the *bla*CTX-M-32 gene in an IncX1 plasmid was verified. Coincidentally, sequence types 410 (birds) and 648 (pigs) harboring *bla*CTX-M-15 are detected in human clinical strains. Conclusions CTX-M-type ESBL-producing *E. coli* strains are widespread in poultry and pig production facilities in the western region; active horizontal transfer seems to be the main route for the dissemination of *bla*CTX-M genes. It is suggested to review the use of antimicrobials in animals and to strengthen good hygiene practices to minimize the risk of propagation of *E. coli* third generation cephalosporins clones.

Keywords: *Escherichia coli* resistant to 3rd generation cephalosporins; extended-spectrum β -lactamases; poultry; swine.

INTRODUCCIÓN

El Plan de Acción Mundial (PAM) publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015 reconoce la importancia de la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos (RAM), ⁽¹⁾ respaldado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). La Colaboración Tripartita reconoce que el desafío de la RAM debe abordarse

con un enfoque de "Una salud", OH por sus siglas en inglés (One Health) pues el desarrollo y la propagación de la RAM no respetan las fronteras entre sectores y, por tanto, requiere una colaboración intersectorial. ^(2,3)

Escherichia coli comensal no patógena es un marcador establecido de contaminación fecal, también constituye un reservorio de genes de resistencia a los antimicrobianos (ARG). La plasticidad genómica de las cepas de *E. coli* patógenas y

comensales contribuye a su desempeño como vehículo de ARG y justifica su utilización como “indicadora” en los planes de vigilancia integrada con el enfoque “Una salud”. Los ARG en *E. coli* se consideran un reflejo de la presión selectiva debido al uso de antibióticos. ⁽⁴⁾ Aunque el conocimiento sobre *E. coli*-R-C3G en animales es limitado, especialmente en países de ingresos bajos y medios. En la actualidad prevalecen BLEE tipo CTX-M que transitaron de hospitales a la comunidad. ⁽⁵⁾

La resistencia a C3G en *E. coli* es comúnmente causada por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) codificadas por las familias de genes *bla*CTX-M, *bla*S-HV y las enzimas AmpC del tipo *bla*CMY. Estos genes se localizan con frecuencia en elementos genéticos móviles, lo que contribuye a su transferencia a otras cepas. El análisis de la RAM en *E. coli* posibilita dilucidar su origen y vínculos epidemiológicos entre cepas derivadas de animales destinados a la producción de alimentos, el medio ambiente y la salud humana. Existen evidencias sobre el papel de las aves de corral y los cerdos como reservorio de *E. coli*-R-C3G en diferentes países del mundo. ^(6,7) En Cuba se informan CTX-M (15, 27, 32 y 55) en humanos, ⁽⁸⁾ pero no existen datos derivados de la producción animal. El trabajo tuvo como objetivos determinar la ocurrencia *E. coli*-R-C3G en aves y cerdos destinados a la producción de alimentos; definir los tipos de betalactamasas que portan las cepas; establecer rasgos de la epidemiología molecular de las cepas.

MÉTODOS

Aislamiento e identificación de *E. coli*-R-third generation cephalosporins en aves y cerdos. Selección de cepas y evaluación de la susceptibilidad *in vitro*

Se realizó un estudio descriptivo transversal dirigido a la caracterización molecular de *E. coli*-R-C3G procedentes de aves y cerdos de la región occidental de Cuba. Durante el período 2013-2015, se colectaron un total de 434 muestras de hisopados cloacales de aves sanas de granjas de gallinas ponedoras y una de pollos de engorde, ubicadas en la provincia Mayabeque, Cuba. La distribución de las muestras, es la siguiente 2013 (n = 139), 2014 (n = 145) y 2015 (n = 150). Durante el período 2016-2018 se tomaron 215 muestras de exudados rectales de cerdos sanos, mostrando la siguiente distribución: 2016 provincia Matanzas, municipio Matanzas (granja n = 42 y matadero n = 10); 2017 municipio Calimete (granja n = 42); 2018 provincia La Habana, municipio La Lisa (matadero n = 57), municipio Caimito (matadero n = 12); provincia Mayabeque San José de las Lajas (granja n = 52). Las muestras se cultivaron en medios selectivos para *Enterobac-*

teriaceae R-C3G (chromID ESBL; bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y medio chromID CARBA (bioMérieux). *E. coli* se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Las cepas se conservaron en glicerol a 20 °C.

La selección de cepas de *E. coli*-R-C3G representativas de ambas colecciones derivadas de aves y cerdos, se basó en la relación genética por reacción en cadena de la polimerasa para elementos palindrómicos repetitivos (*rep*-PCR, de sus siglas en inglés) según condiciones descritas por Vila, J.1996 ⁽⁹⁾ y el sitio de procedencia. Las cepas seleccionadas se utilizaron para la evaluación de la susceptibilidad *in vitro* y la caracterización genética. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 14 antibióticos para 32 cepas procedentes de aves y 27 de cerdos, se determinaron mediante microdilución en caldo Mueller-Hinton, utilizando placas de susceptibilidad EUVSEC Sensititre® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), siguiendo las directrices del fabricante. Se utilizaron los criterios propuestos por Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST) ⁽¹⁰⁾ y por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). ⁽¹¹⁾

Caracterización genética de las cepas derivadas de aves

La identificación de genes de resistencia a antibióticos se realizó por microarreglos de ADN usando ArrayStrip_microarrays AMR08. Los genes de resistencia a β -lactámicos se confirmaron mediante PCR y secuenciación de ADN. ^(12,13) Las sustituciones de aminoácidos en la región determinante de la resistencia a la quinolona de GyrA y ParC se detectaron como se describió por Cano *et al.* ⁽¹⁴⁾ La tipificación por múltiples locus de tipos de secuencias (MLST, de sus siglas en inglés multi locus sequence typing) se realizó según el esquema de Achtman y la base de datos proporcionada por el University College Cork, Irlanda (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). La similitud genética de los aislamientos *E. coli*-R-C3G se determinó mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) usando la enzima *Xba*I. ⁽¹³⁾ Los aislados se sometieron a tipificación de replicón de plásmido utilizando el kit comercial de tipificación basado en PCR (PBRT) (Diaheva, Italia). PBRT determina los grupos *Inc* de las principales familias de plásmidos en *Enterobacteriaceae*. ^(15,16)

Caracterización genética de las cepas derivadas de cerdos. Secuenciación de genomas completos y análisis *in silico*

Se extrajo ADN de 27 cepas mediante el kit AMPure XP (Beckman Coulter). La concentración se cuantificó en el fluorómetro Qubit® 3.0 (Invitrogen) y se ajustó a 1,5 μ g de ADN.

La secuenciación se realizó mediante la tecnología Illumina en la plataforma NovaSeq6000 (Illumina). Las lecturas se sometieron a control de la calidad mediante la herramienta FASTQC 0.11.7 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>). Los genomas se ensamblaron *de novo* mediante SPAdes v3.12 y se visualizaron mediante Geneious v10.1.2 (Biomatters). Los genomas se analizaron *in silico* con las herramientas bioinformáticas en línea del Centro de Epidemiología Genómica (<http://www.genomicepidemiology.org>) ResFinder v3.1 detección de genes adquiridos y mutaciones de resistencia antibiótica, MLST v2.0 basados en el esquema de Achtman para *E. coli* y PlasmidFinder v2.0 para detectar grupos de incompatibilidad (grupos o tipos *Inc*) plasmídica.

Análisis de la estructura circular completa de un genoma representativo de la colección de aislados

Se seleccionó un aislado (PK6 blaCTX-M-32). el ADN genómico se fragmentó usando el dispositivo MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies). La lectura automática de bases se realizó mediante la herramienta Guppy basecaller (v2.3.7) y Guppy barcoder (v2.3.7), respectivamente (Oxford Nanopore Technologies). El genoma de la cepa PK6 se analizó *in silico* con las herramientas bioinformáticas descritas anteriormente.

RESULTADOS

Del total de muestras de aves (434), se recuperaron 62 aislamientos de *E. coli*-R-C3G, en todas las granjas investigadas, 22 de gallinas y 40 de pollos de engorde. Con relación a las muestras colectadas de cerdo (215), se confirmó la presencia de 96 cepas de *E. coli*-R-C3G, 65/136 derivadas de granjas y 31/79 de mataderos, mostrando la siguiente distribución Matanzas 15/52 (28,8 %), Calimete 28/42 (66,7 %), La Lisa 20/57 (35 %), Caimito 8/12 (66,7 %) y San José 25/52 (48 %). Acorde a sus perfiles de *rep*-PCR y la procedencia se seleccionaron 32 cepas de la colección de aves y 27 derivadas de cerdos, para la tipificación en cuanto a susceptibilidad antimicrobiana, características genéticas y epidemiología molecular.

Todas las cepas de *E. coli* recobradas de aves y cerdos fueron sensibles a colistina, carbapenemes y resistentes a cefotaxima en la prueba de susceptibilidad *in vitro*. También mostraron resistencia a otras clases de antibióticos. Las cepas de aves mostraron los siguientes porcentajes de resistencia: tetraciclina (81,0 %), sulfametoxazol (59,0 %), trimetoprim (56,0 %), ácido nalidixico (72,0 %), ciprofloxacina (50,0 %), chloramphenicol (34,0 %) y gentamicina (28,0 %). Las cepas de origen porcino también mostraron altos porcentajes de resistencia a tetraciclina (94,8 %), sulfametoxazol (75,0 %),

trimetoprim (69,8 %) chloramphenicol (44,8 %), ácido nalidixico (51,0 %), ciprofloxacina (31,3 %), gentamicina (27,1 %) y tigeciclina (4,2 %).

En ambas colecciones de cepas y en correspondencia con los perfiles de resistencia fenotípica se encontraron genes que soportan la resistencia a estas familias de fármacos: sulfonamidas (sul1, sul2, sul3), trimetoprima (dfrA1, dfrA7, dfrA12, dfrA14, dfrA17), tetraciclinas [tet (A), tet (B)] y cloranfenicol (cmlA1, floR). Algunos de los aislamientos también contenían los genes de resistencia a la estreptomina strA y strB, el gen de resistencia a la estreptomina/espectinomicina aadA4, y a macrólidos mph(A) y mph (D).

La resistencia a las fluoroquinolonas en las cepas se asoció con la sustitución de aminoácidos en la región que determina resistencia a quinolonas (QRDR, de sus siglas en inglés quinolone resistance- determining regions) que se localiza en las topoisomerasas. Las cepas de aves mostraron los siguientes cambios en la región QRDR, en Gyrase A S83-L (n = 15), D87-N (n=13), D87-Y (n = 1), ParC S80-I (n= 12) y E84-G (n = 2). Además, se encontraron los genes qnr y aac(6)-Ib-cr, que confieren bajos niveles de resistencia a las fluoroquinolonas en 17 y 15 cepas respectivamente (figura 1). En 9 cepas de origen porcino que mostraron altos niveles de resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidixico se encontraron las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región QRDR, GyrA (S83L, D87N, D87Y), ParC (S80I) y además en ParE (S458A). Mientras en 13 cepas con una susceptibilidad disminuida se encontraron solo genes qnrB19 y qnrS1, sin mutaciones en la región QRDR de las topoisomerasas. Hubo 4 aislados que contenían qnrB19 o qnrS1 y exhibieron baja resistencia frente a ácido nalidixico (figura 2).

La caracterización de los genes de resistencia a C3G reveló que 57/59 cepas de *E. coli* aisladas de ambas especies contenían algún alelo del gen blaCTX-M. En *E. coli* de origen aviar se notificaron las variables: blaCTX-M-1 (n = 28), blaCTX-M-15 (n = 4) y blaLAP-2 (n = 1) (figura 1) y en las cepas derivadas de cerdos blaCTX-M-32 (n = 17), seguido de blaCTX-M-15 (n = 5) y blaCTX-M-55 (n = 4). En todas las cepas de cerdos que portaban el gen blaCTX-M-55 se detectó también el gen blaTEM-1B. Otro gen relacionado con la resistencia a C3G que se identificó en cepas de porcino fue blaCMY-2 que codifica para la variante pAmpC CMY-2 (figura 2).

Las cepas de aves predominantes fueron positivas para BLEEs tipo CTX-M-1, pertenecieron a 19 tipos de secuencias (ST), albergaban plásmidos de varios grupos de incompatibilidad y se detectaron en el 85 % (6/7) granjas. Por el contrario, los aislados que contenían CTX-M-15 pertenecían a sólo 2 ST relacionadas filogenéticamente, las ST410 y ST90, aunque procedían de diferentes granjas (figura 1).

El análisis por MLST de las cepas de cerdos mostró una alta diversidad clonal; se encontraron 16 ST de las cuales las ST9360, ST9361 y ST9362 representaron nuevas ST, que se depositaron en la base de datos Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/>). El gen *bla*CTX-M-32 fue predominante, se encontró en cepas pertenecientes a 12 ST distribuidas en granjas y mataderos de todas las provincias estudiadas. Los genes *bla*CTX-M-15 y *bla*CTX-M-55 se encontraron solamente en dos ST cada uno (ST162, ST648) y (ST457, ST2599), respectivamente. El gen *bla*CMY-2, se encontró en dos cepas pertenecientes a la ST648, uno de ellas también contenía el gen *bla*CTX-M-15 (figura 2). En cuanto a la diversidad de replicones de plásmidos en las cepas de origen porcino, se detectaron 13 grupos *Inc*, siendo *Inc*X1 el tipo más predominante y algunos aislamientos albergaron 2 o más tipos de *Inc* (figura 2).

El genoma completo de la Cepa PK6 de cerdos constó de 5 cóntigos circulares con una suma de 4 789 128 pb y un contenido de G + C del 50,8 %, 4582 secuencias codificantes. Los genes (QnrB19, TEM- 1B, Tet(B), GyrA (S83L), ParC (S80I) de resistencia a antibióticos se detectaron en el cromosoma, mientras en el plásmido *Inc*X1 pRHEcCUB-1 de 42 683 pb se confirmaron los siguientes genes *AadA1*, *AadA2*, *CmlA1*, *DfrA12*, *QacH2*, *Sul3* (In640); CTX-M-32. En este plásmido además se detectó un gen de resistencia a desinfectantes de compuestos de amonio cuaternario. (17)

DISCUSIÓN

Las infecciones por bacterias productoras de BLEE se asocian a estancias hospitalarias prolongadas y cada vez se informan con más frecuencia a nivel comunitario. (18) Sin em-



Fig. 1. Características genéticas y árbol filogenético construido a partir del patrón de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de 32 aislados de *E. coli* resistentes a cefalosporina de tercera generación (Ec-R-C3G) de aves de corral en la provincia Mayabeque. Cepa: cepa Id; las granjas se representan con las letras de la A-G; ST: tipo de secuencia; PhG: filogrupos; Inc plásmidos: grupos de incompatibilidad de plásmidos. Antibióticos AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; CIP: ciprofloxacina; NAL: ácido nalidíxico; GEN: gentamicina; SMX: sulfametoxazol; TMP: trimetoprima; TET: tetraciclina; CHL: cloranfenicol; AZI: azitromicina. Genes y funciones de resistencia a los antimicrobianos: genes *d* β-lactamasa de espectro extendido *bla*CTX-M para resistencia a cefalosporinas de tercera generación, *aadA4*: gen de nucleotidiltransferasa de aminoglucósidos para resistencia a estreptomina y espectinomina; *cmlA1*, gen de eflujo de cloranfenicol; *flor*, gen de resistencia al florfenicol / cloranfenicol; *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA17* y *drfA19* = gen de dihidrofolato reductasa para la resistencia a trimetoprima; *tet*(A), *tet*(B), gen de eflujo de tetraciclina; *strA*, *strB*, gen de estreptomina fosfotransferasa; *su*1, *su*2, *su*3 = gen dihidropteroato sintasa para la resistencia a la sulfonamida; *mrx*-*mph* (A), *mrx*-*mph* (D) grupo de genes de inactivación de macrólidos; *mph* (A), *mph* (D) macrólidos fosfotransferasas; proteína hidrófoba *mrx* con función desconocida; *aac*(6)-*lb*-*cr*, gen aminoglucósido N (6') - acetiltransferasa-*cr* para resistencia a amikacina, kanamicina y quinolona; *qnrB*, *qnrS*, gen de protección de la ADN girasa para un bajo nivel de resistencia a las fluoroquinolonas. *GyrA* (S83-L), (D87-N), (D87-Y) y *ParC* (S80-I), (E84-G), sustituciones de aminoácidos en topoisomerasa *GyrA* y *ParC* confiere altos niveles de resistencia a las fluoroquinolonas.

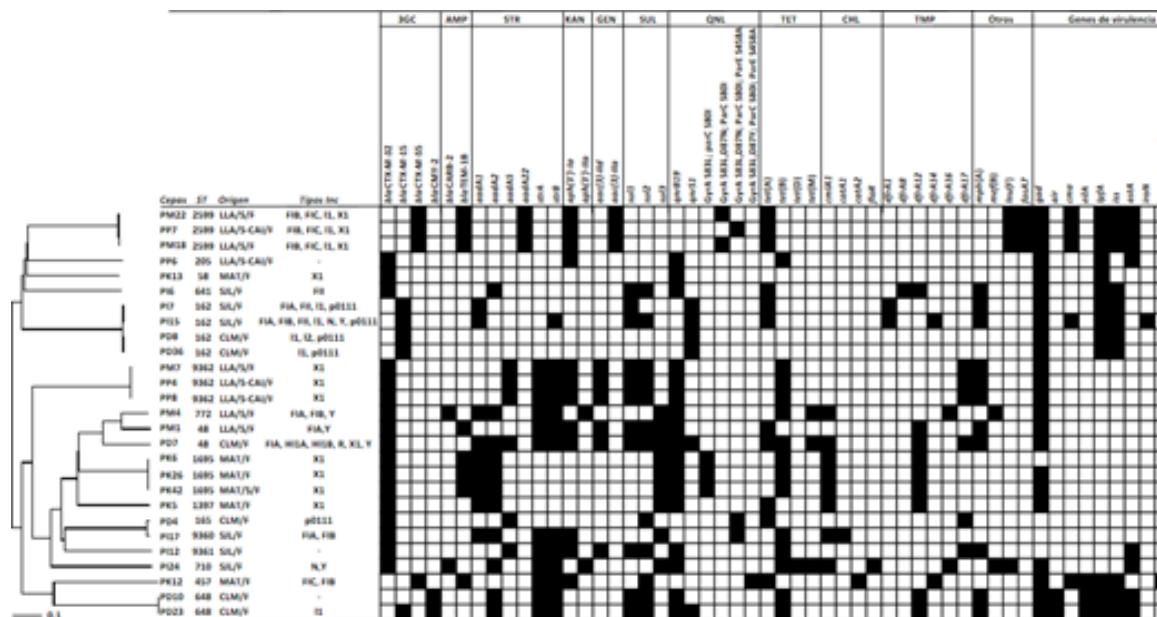


Fig. 2 Árbol filogenético basado en el método Neighbor-Joining (NJ) y en el esquema de cgMLST estable para la especie *E. coli* que incluye 2513 genes, de 27 aislados secuenciados de *E. coli*-R-C3G procedentes de cerdos sanos en Cuba. La figura además incluye la distribución de los tipos de secuencia (ST) ($n = 12$), tipos de incompatibilidad (Inc) ($n = 13$), genes de resistencia a antibióticos ($n = 39$) y de virulencia ($n = 9$) presentes en los aislados secuenciados de *E. coli*-R-C3G. Leyenda: Antibióticos: C3G, cefalosporinas de tercera generación; AMP, ampicilina; EST, estreptomicina; KAN, kanamicina; GEN, gentamicina; SUL, sulfonamidas; QNL, quinolonas; TET, tetraciclinas; CLF, cloranfenicol; TMP, trimetoprim; Otros: macrólidos, lincosamidas, fosfomicina. Lugares de muestreo: CLM/G: Granja de Calimete; LLA/M/G: Matadero de La Lisa (cerdos procedentes de granja en La Lisa); MAT/G: Granja en Matanzas; MAT/S: Matadero en Matanzas; SJL/G: Granja en San José de Las Lajas; LLA /M-CAI / G: Matadero en La Lisa (cerdos procedentes de granja en Caimito).

bargo, aún no se estima la carga global de estas infecciones en los animales de granja. La transmisión puede ocurrir de persona a persona, o de fuentes animales a personas a través de la cadena alimentaria.⁽⁴⁾ Por tanto, el papel potencial de los animales como reservorio de estos microorganismos para los seres humanos hace necesario un enfoque interdisciplinario de “Una salud” para mantener esta amenaza bajo control.⁽³⁾

En este estudio se demostró la ocurrencia de cepas comensales de *E. coli*-R-C3G, en muestras de aves y cerdos sanos, lo cual coincide con informes generados en otros países que mostraron su prevalencia en la crianza animal.^(19,20) Este es el primer informe en Cuba que notifica en *E. coli* de aves las variantes CTX-M-1 y CTX-M-15 y en cepas de cerdos CTX-M-32, CTX-M-15 y CTX-M-55. Ambas colecciones de cepas mostraron altos niveles de resistencia a tetraciclinas y fluoroquinolonas, antibióticos clínicamente importantes en medicina humana y veterinaria. Las cepas bacterianas resistentes a C3G se aíslan de animales de producción, aun cuando se crían en ausencia de cefalosporinas. Esto ocurre por la coselección de los genes de resistencia a antibióticos no betalactámicos que se localizan en los mismos elementos genéticos que transportan genes para la expresión de BLEE.⁽²¹⁾ Por tanto el uso de tetraciclinas, aminoglucósidos, sulfo-

namidas y trimetoprim, que en Cuba están autorizados para la producción animal,⁽²²⁾ podría favorecer la coselección de estas cepas. La observancia de cepas indicadoras de *E. coli*, a través de su fondo genético para la RAM pueden ser un reflejo del uso de los antibióticos, requiriendo implementar medidas para preservar su efectividad.⁽²³⁾

El tipo blaCTX-M-1 fue abundante en *E. coli* de aves, esta tendencia también se ha observado en Europa.⁽²⁴⁻²⁶⁾ Aunque el grupo CTX-M-1 es amplio y comprende una diversidad de subtipos, que requieren de estudios adicionales basados en técnicas de secuenciación de última generación para esclarecer con precisión cuales albergan las cepas de aves. Sin embargo, en *E. coli* de cerdos blaCTX-M-32 fue dominante. Es posible que las cepas que albergan ambas variantes blaCTX-M-1 y blaCTX-M-32 en aves y cerdos respectivamente, aprovechen una ventaja selectiva particular, por colonización o adaptación metabólica al aparato digestivo en estos animales.

Los resultados indicaron que cepas de *E. coli* CTX-M están extendidas en instalaciones de producción de aves y cerdos en la región occidental, lo cual no parece ser un evento esporádico. La diversidad de las cepas, su baja tasa de clonalidad, incluso dentro de una misma granja, la presencia

del mismo grupo de incompatibilidad plásmidica y el tipo de BLEE en diferentes granjas, señala como la vía más activa de propagación la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles con limitaciones a estos sitios o quizás por la adquisición de múltiples fuentes.

Los mecanismos de transmisión de bacterias productoras de β -lactamasas aún no están esclarecidos, por ellos es necesario considerar posibles fuentes de contaminación múltiples, como el ambiente, las moscas, heces de otros animales y humanos. ^(27,28) Como los cerdos y las aves de corral forman parte de líneas de producción en las que se aplican medidas de bioseguridad, podría ser menos probable que se introduzcan cepas procedentes de una amplia variedad de fuentes en su entorno, de ahí la importancia de reforzar las medidas de higiene y saneamiento en estas instalaciones. ⁽²⁹⁾ La presencia de *E. coli* R-C3G en exudados cloacales de aves supone un riesgo para la producción y manipulación de huevos, principal renglón derivado de la producción aviar en Cuba. El huevo y las heces comparten el mismo entorno dentro y fuera del ave. Estos resultados indican fortalecer las buenas prácticas de higiene y saneamiento para minimizar el riesgo de propagación de determinantes de la resistencia a los antimicrobianos.

Este estudio permitió obtener y recopilar información preliminar sobre la diversidad de *E. coli* portadora de blaCTX-M y sus respectivas variantes genéticas en aislados de pollos y cerdos. El tipo de secuencia 131, la más relevante desde el punto de vista clínico en los seres humanos, no se encontró. Sin embargo, se detectaron cepas de las ST 410, 10 y 648 de importancia clínica en humanos que han sido informadas en otras partes del mundo ^(7,20,21) y en Cuba. ⁽⁸⁾

Recientemente, Quiñones y col. (2020) ⁽⁸⁾ informaron la presencia de los genes blaCTX-M-32, blaCTX-M-15, blaCTX-M-55 y blaCMY-2 en cepas de *E. coli* resistentes a C3G recobradas de infecciones extraintestinales en humanos en Cuba, la variante blaCTX-M-15 se encontró en el mayor porcentaje de los aislados. Interesantemente la variante blaCTX-M-32, se detectó en un paciente en Matanzas, también mostró predominio en las muestras de cerdos colectadas de esta provincia. Algunos autores han sugerido que CTX-M-55 y CTX-M-32 proceden de fuentes animales, incluidos ganado bovino y porcino. ⁽³⁰⁾ Los aislados de ST410 recobrados en aves y de ST 648 y 162 de cerdos contienen CTX-M-15, el tipo de BLEE predominante en *E. coli* humana a nivel mundial. ⁽³¹⁾

Uno de los elementos más importantes a considerar en la diseminación de la RAM es la presencia de genes de resistencia localizados en plásmidos autotransferibles. En este estudio se detectaron diferentes tipos de replicones en las cepas multirresistentes de *E. coli* productoras de BLEE derivados de

aves y cerdos. Además el genoma circular ensamblado de la cepa PK6 corroboró la localización del gen blaCTX-M-32 en el plásmido pRHEcCUB-1, experimentos de conjugación serían necesarios para esclarecer la capacidad para su diseminación.

La relación genética entre cepas de diferentes orígenes y los elementos genéticos que contienen CTX-M aún no se ha investigado en Cuba; tal investigación requeriría la caracterización basada en el genoma completo de los aislados con énfasis en plásmidos e información epidemiológica a gran escala. ^(32,33) En este estudio se detectaron diferentes tipos de replicones en las cepas multirresistentes de *E. coli* productoras de BLEE derivados de aves y cerdos. Además, el genoma circular ensamblado de la cepa PK6 corroboró la localización del gen blaCTX-M-32 en el plásmido pRHEcCUB-1, experimentos de conjugación serían necesarios para esclarecer la capacidad para su diseminación. La secuenciación de genomas completos es de gran utilidad en los programas de vigilancia integrada, permite distinguir bacterias con patrones de resistencia idénticos, pero causados por diferentes mecanismos, facilitando un nivel de detalle que refinará la comprensión de la resistencia. ⁽³⁴⁾

Conclusiones

Los datos muestran que genes de resistencia a múltiples antibióticos, junto a los genes BLEE se albergan en diversos linajes de *E. coli* comensal para cerdos y aves. Aunque se observa diseminación de algunos clones, se propone como principal vía para la propagación de los genes de resistencia la transferencia horizontal. Estos hallazgos son indicativos de posibles fallos en la gestión del uso de antibióticos en el sector de la producción animal o de falta de higiene durante el proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [Internet] 2017. [Consultado 9 oct 2018] Disponible en línea en: http://who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
2. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO). The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Internet] 2016. [Consultado 29 oct 2018]. Disponible en línea en: <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>
3. Organization for Animal Health (OIE). OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. [Internet] 2018. [Consultado 12 feb 2020]. Disponible en línea en: https://rr-africa.oie.int/wp-content/uploads/2019/09/annual_report_amr_3.pdf
4. Tyson GH, Li C, Hsu C-H, Bodeis-Jones S and McDermott PF Diverse Fluoroquinolone Resistance Plasmids From Retail Meat

- E. coli in the United States. *Front. Microbiol.* 2019;10:2826. DOI: 10.3389/fmicb.2019.0282.
5. Lalaka A, Dariusz Wasyła, Zajaca M, Skarzynska M, Hoszowska A, Samcika I, Woźniakowski G, Szulowska K. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Vet. Microbiol.* 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.023>
 6. EFSA. (2011). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA J.* 9:2322.
 7. Saliu EM, Vahjen W. and Zentek J. Types and prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. *Anim Health Res Rev.* 2017;18(1):46-57.
 8. Quiñones DM, Aung S, Carmona Y, González MK, Pereda N, Hidalgo M, Rivero M, A. Zayas, R. Del Campo, Urushibara N. and Kobayashi N. High Prevalence of CTX-M Type Extended-Spectrum β -Lactamase Genes and Detection of NDM-1 Carbapenemase Gene in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Cuba. *Pathogens (Basel, Switzerland).* 2020;9(1):65.
 9. Vila J, Marcos MA, and Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol.* 1996;44(6):482-9.
 10. Clinical and L. S. I. J. C. s. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA. 2017.
 11. EUCAST, T. J. V. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Basel. 2015.
 12. Poirel L, V. Cattoir A, Soares CJ, Soussy and P. Nordmann (2007). Novel Ambler class A β -lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):631-7.
 13. Endimiani A, Rossano A, Kunz D, Overesch G. and Perreten V. First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):31-8.
 14. Cano ME, Rodríguez-Martínez JM, Agüero J, Pascual A, Calvo, J, García-Lobo JM, Velasco C, Francia MV and Martínez-Martínez L. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2033-9.
 15. Clermont O, Christenson JK, Denamur E. and Gordon DMJ. *Emr*. The *Clermont* *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. 2013;5(1):58-65.
 16. Carattoli, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-38.
 17. Hernández-Fillor RE, Brillhante M, Espinosa I, Perreten V. Complete Circular Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain from Cuba Obtained with Nanopore and Illumina Hybrid Assembly. *Microbiol Resour Announc.* 2019;8(48). DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.01269-19>
 18. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL and Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-28.
 19. Cantón, R. and T. M. Coque. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466-75.
 20. Mir RA, Weppelmann TA, Teng L, Kirpich A, Elzo MA, Driver JD y Jeong KCJ. F.21. M. Colonization dynamics of cefotaxime resistant bacteria in beef cattle raised without cephalosporin antibiotics. 2018;9:500.
 21. Adefioye OJ, Weinreich J, Rödiger S, Schierack P and Olowe OA-JMDR. Phylogenetic characterization and multilocus sequence typing of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from food-producing animals, beef, and humans in Southwest Nigeria. 2021;27(1):111-20.
 22. Silva KC, Moreno M, Cabrera C, Spira B, Cerdeira L, Lincopan N y Moreno AM. 2016. First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Strains Belonging to Sequence Type (ST) 410, ST224, and ST1284 from Commercial Swine in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:2505-8.
 23. Blaak H, Van Hoek AH, Hamidjaja RA, Van der Plaats RQ, Kerkhof-de Heer L, de Roda Husman AM and Schets FM. Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135402.
 24. Instituto de Medicina Veterinaria. Listado Oficial de Productos Veterinarios Registrados. Grupo de registro de productos de uso veterinario. 2018:1-138.
 25. Dhanji H, Murphy NM, Doumith M, Durmus S, Lee SS, Hope R, Woodford N and Livermore DM. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(12):2534-37.
 26. Doi Y, Iovleva A and Bonomo RA. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of travel medicine.* 2017;24(suppl_1):S44-S51.
 27. Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri Junior A and Darini AL. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;85(4):444-8.
 28. Vinueza-Burgos C, Ortega-Paredes D, Narvaez C, De Zutter L and Zurita J. Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PLoS One.* 2019;14(4):e0207567.
 29. Blaak H, Hamidjaja RA, Van Hoek AH, de Heer L, de Roda Husman AM and Schets FM. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(1):239-46.
 30. European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J.* 2019;17(2):5598:278.
 31. Bevan ER, Jones AM and Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(8):2145-55.
 32. Peirano G and Pitout JDD. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs.* 2019;79(14):1529-41.
 33. Dame-Korevaar A, Fischer EAJ, Van der Goot J, Stegeman A and Mevius D. Transmission routes of ESBL/pAmpC producing bacteria in the broiler production pyramid, a literature review. *Preventive Veterinary Medicine.* 2019;162:136-null.

34. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene based approaches. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24:350e354.

Recibido: 12/12/2022

Aprobado: 13/02/2023

Agradecimientos

Los autores agradecen a los gestores, al personal de las explotaciones avícolas, porcinas y mataderos su amable cooperación en el muestreo. Además, los autores agradecen a Gisleibys Miranda, Yaday Alfonso y Marisela Santos por la asistencia técnica. A Alexandra Collaud, Michael Brillant y Carelia Martha Marrero por su contribución al procesamiento de muestras y datos.

Conflictos de intereses

Los autores declaran la no existencia de conflictos de interés en relación con la investigación presentada.

Contribución de los autores

Conceptualización: Ivette Espinosa, Vincent Perreten

Curación de datos: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz

Análisis formal: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz, Ivette Espinosa, Vincent Perreten

Adquisición de fondos: Vincent Perreten, Ivette Espinosa

Investigación: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz, Ivette Espinosa, Vincent Perreten

Metodología: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz, Vincent Perreten, Ivette Espinosa

Administración del proyecto: Vincent Perreten, Ivette Espinosa

Recursos: Vincent Perreten, Ivette Espinosa

Software: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz, Vincent Perreten, Dasiel Obregón

Supervisión: Vincent Perreten, Ivette Espinosa

Validación: Vincent Perreten, Ivette Espinosa

Visualización: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz, Vincent Perreten, Dasiel Obregón

Redacción-borrador original: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz

Redacción revisión y edición: Rosa Elena Hernández, Michel Baéz, Vincent Perreten, Ivette Espinosa, Dasiel Obregón, Ángel L. Feria, Pastor Alfonso

Financiación

Este estudio fue financiado con fondos internos del Instituto de Bacteriología Veterinaria de la Universidad de Berna, Suiza, y por el Centro Nacional de Sanidad Animal y Vegetal de Cuba. Se recibió apoyo financiero de dos Becas de Excelencia del Gobierno Suizo para los estudiantes extranjeros (no 2015.0815) y (no. 2018.0714) de proyectos del Programa nacional de Salud animal.

Cómo citar este artículo

Hernández Fillor RE, Báez Áreas M, Espinosa Castaño I, Perreten V et al. *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de 3ra generación de aves y cerdos, reservorio para la diseminación de genes de multiresistencia. *An Acad Cienc Cuba* [internet] 2023 [citado en día, mes y año];13(2):e1407. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1407>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

