

PRIMEROS HALLAZGOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN ESPECIES DE BACTERIAS PATÓGENAS, ZONÓTICAS Y COMENSALES EN LA PRODUCCIÓN PORCINA EN CUBA

AUTORES PRINCIPALES: Ivette Espinosa Castaño¹ y Michel Báez Areas¹

UNIDAD EJECUTORA PRINCIPAL DEL RESULTADO: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria¹.

OTROS AUTORES: Karelía Martha Marrero Moreno³, Vincent Perreten², Evelyn Lobo¹, Siomara Martínez¹, Marta Mora Llanes², Alexandra Collaud², Pastor Alfonso Zamora¹, Rosa Elena Hernández³.

COLABORADORES: Gysleibis Miranda Silva¹, Marisela Santos¹, Yaday Alfonso Mirabal¹, Belkis Corona González¹, María Iriam Percedo Abreu¹, Aleika Iglesias Lozano¹, Odalys Uffo Reynoso¹, Nivian Montes de Oca Martínez¹, Ondina León Días¹, Mercedes Martha Mora Llanos³, Tania García Morey³, Odalys Pérez Benitez, Norma González Socorro³

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES: ²Instituto de Bacteriología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Berna, Suiza. ³CPHEM Centro Provincial Higiene y Epidemiología, Matanzas. ⁴Matadero “ Empresa Cárnica Nueva Paz” Mayabeque, 2017

AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA:

Ivette Espinosa Castaño

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Apdo. 10, San José de Las Lajas 3270

espinosa@censa.edu.cu

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un desafío para la salud humana y animal. La OMS, FAO y OIE, bajo el enfoque de Una Salud, se han pronunciado para su contención en el más breve plazo posible. En Cuba la magnitud de la RAM en la crianza animal ha sido poco investigada. El presente estudio caracterizó la resistencia antimicrobiana en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina en provincias de la región occidental, constituyendo una contribución local a las acciones globales que se desarrollan. Las cepas de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* identificadas, a partir de cerdos con procesos respiratorio, fueron resistentes a tetraciclina y espectinomicina y sensibles a antibióticos β -lactámicos y quinolonas, sin embargo expresaron otras formas de resistencia como la formación de biopelículas y de células persistentes, que contribuyen a tolerar estos antibióticos, lo cual explica fracasos terapéuticos y las infecciones recurrentes que ellas causan. La estrategia *in vitro* de uso combinado de antimicrobianos fue efectiva en la inhibición de estos atributos de resistencia. La presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina fue detectada por primera vez en cerdos sacrificados en matadero con destino al consumo humano. Se estableció la composición de los clones que conforman estas cepas y se comprobó la presencia del clon pandémico USA300-ST8. Otro resultado fue la presencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), en granjas y mataderos, con capacidad para la transmisión de genes móviles de resistencia y alta implicación en los esquemas de tratamiento. La información obtenida permite orientar medidas de prevención y control dirigidas a evitar la diseminación de estas bacterias y su transmisión entre hombres y animales. Los resultados están avalados por 10 publicaciones, destacando: International Journal of Antimicrobial Agent (FI:4. 307) y Polish Journal of Microbiology (FI:0,993), entre otros eventos y trabajos de tesis. No se ha presentado a premio anteriormente.

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un evento de importancia en la salud humana y animal. El uso indiscriminado de los antibióticos y su impacto en la RAM, han sido reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que en el año 2015 definió un *Plan de Acción Global*, requiriendo de los países miembros un Plan Nacional. La Organización Mundial de Salud Animal (OIE) y la Organización de Naciones Unidas sobre Alimentos y Agricultura (FAO), también se han sumado a este propósito. Las estrategias para la contención de la RAM, se apoyan en investigaciones que aporten datos locales sobre tendencias en la resistencia y faciliten los análisis de riesgos para su contención (OMS, 2015).

La crianza del cerdo en Cuba, es la principal fuente de proteína para la población, por tal motivo preservar su salud es prioridad. Las bacterias patógenas que afectan la salud porcina precisan un diagnóstico adecuado que incluye además, los perfiles de

susceptibilidad microbiana (SM) para garantizar un correcto uso de los antibióticos. Debido al alarmante incremento de la RAM, es necesario detectar la posible presencia de bacterias con potencial zoonótico o comensales, que contienen genes de resistencia en elementos móviles (plásmidos), que se propagan a través de la transferencia horizontal. Estas bacterias colonizan al cerdo y pueden ser diseminadas en la cadena de producción de alimentos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son las especies de mayor impacto (Schmithausen y col., 2015).

Las infecciones causadas por SARM en humanos son un reto, por su virulencia y la multiresistencia, asociada a elementos genéticos móviles de amplia propagación, se describen clones pertenecientes a las secuencias tipos (ST), ST1, ST8, ST80, ST59, ST30 diseminados a nivel global. La ST8 (clon USA300) presenta tres factores de virulencia: el elemento móvil para el catabolismo de la arginina (ACME I), casete cromosómico staphylococico *mec* (SCC*mecIVa*) y la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). Este clon causa infecciones a pacientes en la comunidad (SARM-AC) y en el ámbito hospitalario (SARM-AH). USA300 con el casete SCC*mecIVc* y negativo para ACME emergió en el norte de Sur América y se ha denominado Variante Latinoamericana (USA300-VL) (García y col., 2014; Schmithausen y col., 2015). En Cuba USA300 fue reportado en el año 2015 en infecciones asociadas a la comunidad (Leiva y col., 2015) y USA300-VL no ha sido identificado hasta el momento. Los cerdos principalmente a nivel mundial portan el linaje ST398, asociados al ganado (SARM-AG), pero hasta el momento no existen datos publicados sobre SARM-AG en Cuba.

El incremento de intoxicaciones alimentarias y de procesos urémicos por cepas de *E.coli* productoras de BLEE resistentes a betaláctamicos, en pacientes en la comunidad, sugiere su diseminación en diferentes entornos, como la crianza intensiva de especies animales para el consumo humano (Schmithausen y col., 2015). A partir de estos antecedentes el objetivo general de este trabajo fue determinar la resistencia a antibióticos en especies de bacterias patógenas (*S.suis* y *P.multocida*), zoonóticas (SARM) y comensales (Enterobacterias productoras de BLEE) asociadas a la crianza porcina en Cuba.

Los estudios se realizaron en el laboratorio de Bacteriología Animal del CENSA, que por procedimientos de diagnóstico de rutina, dispone de una colección de cepas patógenas de *S. suis* y *P. multocida*, establecida desde el año 2002-2016, obtenida de cerdos (categoría preceba y ceba), enfermos con procesos respiratorios y artritis, procedentes de granjas ubicadas en las provincias Mayabeque, Pinar del Río y Matanzas. Para la detección de SARM se tomaron 285 exudados nasales en cerdos de matadero procedentes de las provincias Mayabeque (n=67), Matanzas (n = 90) y Cienfuegos (n = 128) en el año 2015, mientras la detección de enterobacterias productoras de BLEE se realizó a partir de 200 hisopados tomados del recto de animales sanos, (categoría pre-ceba), de manos de personal, superficies, así como

de utensilios para la alimentación y manipulación de animales en tres granjas y dos mataderos en Matanzas durante los años 2016 y 2017.

La metodología general se basó en el uso de técnicas de ácido nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés), la secuenciación, la tipificación por geno-serotipificación, la aglutinación con antisueros específicos y las pruebas de difusión con discos según el CLSI (2016).

En la crianza porcina cubana los problemas respiratorios son la segunda causa de muerte (DSA, 2016), son procesos complejos por su etiología, en los que aún el diagnóstico precisa discriminación microbiológica, clasificación intra-especie, acorde a estándares internacionales. *S.suis* ocasiona procesos respiratorios y sistémicos (artritis, meningitis y endocarditis), incluso en humanos con riesgo ocupacional, es una especie heterogénea, en la cual se incluyen 33 serotipos diferentes en cuanto a su distribución y virulencia. El estudio de la diversidad intra-especie de las cepas de *S. suis* que forman parte de la colección evidenció los siguientes serotipos capsulares en las cepas que fueron aisladas entre los años 2008-2015. 1, 1/2, 2, 3, 9, 13, 23, 24, 31, donde el serotipo 2 fue el más frecuente y se aisló de animales con neumonía y artritis. *P. multocida* es una bacteria asociada a la neumonía porcina y conformada por 5 serotipos capsulares (2). El serotipo capsular A de *P. multocida* se encontró mayoritariamente, y con muy baja frecuencia el D, todos aislados de cerdos con neumonía.

El estudio de la SM reveló un incremento en la resistencia de los aislados de *S. suis* y *P. multocida* colectados a partir del año 2008, con respecto a los aislados de los años 2002-

2004. La tetraciclina y espectinomicina, de uso común en la ganadería porcina, no fueron efectivos *in vitro* para ninguno de los aislados de ambas especies. Los antimicrobianos que

mostraron mayor eficacia fueron los betalactámicos, quinolonas y sulfametoxazol/trimetoprim.

La detección de expresiones de resistencia transitoria en cepas de *S.suis* y *P.multocida* que fueron sensibles a betalactámicos y quinolonas, reveló la capacidad de resistir a estos compuestos. Las cepas no tipificadas de *S. suis* formaron biopelículas que fueron más resistentes a penicilina, que su contraparte en crecimiento plantónico, las cepas de *P. multocida* no formaron biopelículas. La combinación de penicilina y el agente mucolítico N- acetil cisteína permitió la reducción en la formación de las biopelículas de *S.suis in vitro*.

Por otra parte, las cepas de *S. suis* y *P. multocida* que fueron sensibles en las pruebas de difusión con discos, formaron células persistentes, bajo la acción de β -lactámicos y quinolonas. Esta es la primera vez que se describe la formación de células persistentes

por *P.multocida* y corrobora este comportamiento previamente descrito por otros autores en cepas de *S.suis* (Willenborg y col., 2014). El ensayo de potenciación mostró que es posible la erradicación de células persistentes *in vitro* a través de las combinaciones de aminoglucósido (gentamicina) con glicerol y gentamicina con arginina. La manifestación de estos fenotipos de resistencia transitoria no asociada a cambios genéticos puede explicar fracasos terapéuticos y recurrencia en infecciones respiratorias, que suelen presentarse en forma subclínica, reduciendo la capacidad pulmonar y la eficiencia en la ganancia en peso del animal.

En cuanto a la detección de bacterias con potencial zoonótico, en este trabajo se encontró una prevalencia de 7,7% de SARM en exudados nasales de cerdos. La estructura genética de los aislados, evidenció tres grupos clonales: grupo 1 (PFGE I) clon ST8-t024-IV, SCCmecIVa, *dru* dt9g [LPV+/ACME I+] (9/22) con genes para las enterotoxinas *sek* y *seq*, genes de resistencia a β -lactámicos, macrólidos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas similar al clon USA300. El segundo grupo USA300-VL, (PFGE II) ST8-t008-IV, SCCmecIVc, *dru* dt7j [LPV+/ACME-] (9/22), *sek-seq* solo presentó resistencia a β -lactámicos. La tercera agrupación (PFGE III) comprendió clones de la ST5, *spa* t010, SCCmecIVc, *dru* dt10a [LPV-, ACME-] (4/22), los cuales portan los genes para varias enterotoxinas y mostraron resistencia a β -lactámicos y aminoglucósidos. Este estudio reveló que cerdos en Cuba son colonizados por SARM, predominantemente asociados al clon pandémico USA300-ST8, el cual causa severas infecciones en piel, tejidos blandos y neumonía necrotizante, fatal en humanos.

En granja y matadero en Matanzas, se detectaron 16 cepas de *E. coli* BLEE positivas por pruebas fenotípicas y genotípicas. La detección por PCR reveló una mayor frecuencia del gen *bla* CTX-M, acorde a la situación epidemiológica que se describe en la actualidad para las enzimas BLEE. Este estudio evidencia la diseminación de cepas de *E.coli* BLEE+ en ámbitos no clínicos, existiendo reservorios de dichos microorganismos en la microbiota intestinal en los animales, que pueden ser un vehículo importante para su transferencia al hombre y a otros animales.

Finalmente el trabajo aporta resultados concluyentes que explican la necesidad de evaluar las propuestas terapéuticas para controlar las infecciones por *S.suis* Y *P.multocida*. Demuestra que la microbiota nasal e intestinal de animales sanos destinados al consumo humano, supone un reservorio de genes de resistencia que al estar localizados en estructuras genéticas con una alta capacidad de movilización, pueden ser fácilmente diseminados entre bacterias de origen animal y en el entorno humano. Los resultados proporcionan las bases para los análisis de los factores que contribuyen al aumento alarmante de estas bacterias resistente en diferentes ecosistemas, lo que exigirá el trabajo conjunto y coordinado de todos los sectores implicados en la cadena de producción y consumo de cerdos en Cuba. Por primera vez en Cuba se caracterizan la resistencia microbiana de especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina, lo cual es una contribución local a las acciones globales para la contención de la RAM.

REFERENCIAS

1. OMS. Proyecto de plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos Resistencia a los antimicrobianos Organización mundial de la salud 68 Asamblea mundial de la Salud A 68/20.2015.

2. Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, et al. (2015) Analysis of Transmission of MRSA and ESBL among Pigs and Farm

Personnel. PLoS ONE 10 (9):

3. García ML, Hendriksen RS, Fraile L and Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and

resistance in veterinary medicine. Veterinary Microbiology. 2014(170); 1–9.

4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). (2016). Performance Standards for

Antimicrobial Susceptibility Testing 26th ed. CLSI Supplement Informational Supplement

M100S. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA

5. Leiva Peláez O, Stojanov M, Zayas Tamayo AM, Barreras García G, González Alemán M, Martínez Ceballos, L., et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 4 Cuban hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 81:1–3.

6. Willenborg J, Willms D, Bertram R, Goethe R and Valentin-Weigand P. Characterization of multi-drug tolerant persister cells in *Streptococcus suis*. BMC Microbiology. 2014;

14:120.

7. Wang S., Y. Y., Y. Zhao, H. Zhao, J. Bai, J. Chen, Y. Zhou, C. Wang and Y. Li 2016. "Sub-MIC Tylosin inhibits *Streptococcus suis* biofilm formation and results in differential protein

expression." Frontiers in Microbiology 7: 9.

8. Bram Van den Bergh, Maarten Fauvart, Jan Michiels. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters FEMS Microbiol Rev (2017) 41

(3): 219-251.

La originalidad e impacto científico de este trabajo están dados por la siguiente contribución al conocimiento:

1. Por primera vez en Cuba se determinan mecanismos de resistencia en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina, lo cual es una contribución local a las acciones globales para la contención de la RAM.

2. Se confirma el diagnóstico según estándares internacionales de dos especies patógenas para el cerdo *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis*

3. Se identifican cepas de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* resistentes *in vitro*

a tetraciclina y espectinomicina, y se revela que aún cuando son susceptibles a otros antibióticos como β -lactámicos y quinolonas, llegan a expresar otras formas de

resistencia como la formación de biopelículas y de células persistentes que contribuyen a recidivas de las infecciones que ellas causan

4. Las estrategias de uso combinado de agentes antimicrobianos *in vitro* demostraron resultados favorables en la destrucción de biopelículas de *S.suis*, con el uso de Penicilina y N-acetyl cisteína, y de las células persistentes de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* mediante las combinaciones gentamicina con glicerol y arginina.

5. Se determina por primera vez la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en cerdos sacrificados en matadero con destino al consumo humano. Se estableció la composición de los clones que conforman estas cepas y se comprobó la presencia del clon pandémico USA300-ST8.

6. Se determina por primera vez la presencia de cepas de *E.coli* productoras de BLEE a partir de muestras de hisopados rectales, manos de operarios, superficies e instrumentos de trabajo, sugiere que estas instalaciones son reservorios de estas cepas y facilitan su diseminación desde el excremento de los cerdos al ambiente circundante.

7. Se detectaron mayoritariamente cepas de *E.coli* productoras de BLEEs del tipo CTX- M y en menor medida del tipo TEM, acorde a la situación epidemiológica actual para

las enzimas BLEE.

La importancia práctica del trabajo radica en:

1. La información obtenida es de valor para orientar medidas de prevención y control dirigidas a evitar la diseminación de estas bacterias zoonóticas y su transmisión entre el hombre y los animales, al revelar su presencia.

2. Se dispone de las siguientes colecciones microbianas: *S.suis*, *P.multocida*,

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* productora de Betalactamasa de espectro extendido (BLEE) identificadas y caracterizadas en cuanto a virulencia y mecanismos de resistencia, que son útiles:

- Como controles en investigaciones para el desarrollo y aplicación de ensayos de diagnóstico.

- En el estudio de expresiones de resistencia adquirida y transitoria de nuevas cepas correspondientes a estas especies y de otras especies.

- En la evaluación de propuestas antimicrobianas (extractos de plantas, péptidos, combinaciones de medicamentos ya existentes) *in vitro* e *in vivo*.