

Análisis de resistencias a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* aisladas en aves en España de 1998 a 2013

N. ANTILLES *, A. BLANCO, Q. CAMPRUBÍ, R. JOVE y M. BIARNÉS

Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC), 43206 Reus, Tarragona, España.

* E-mail: nantilles@cesac.net

Uno de los microorganismos más ampliamente distribuidos en avicultura que afecta a aves de todas las edades y categorías es *Escherichia coli*. La caracterización fenotípica, mediante antibiogramas, de cepas de *E. coli* puede ser muy útil para el sector avícola ya que permite además de la elección del mejor tratamiento, monitorizar la evolución de las resistencias bacterianas en los últimos años. Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar los resultados obtenidos de antibiogramas realizados en 2623 cepas de *E. coli* aisladas en aves desde el año 1998 al 2013. Se obtuvo un elevado número de cepas resistentes a antibióticos de uso en veterinaria. Las principales resistencias se observaron frente a enrofloxacin, doxiciclina y amoxicilina. Mientras que los dos primeros antimicrobianos sufren un incremento del porcentaje de cepas resistentes en los últimos cinco años, las resistencias a amoxicilina se mantienen elevadas durante todos los años (70,4 % de las cepas analizadas). También se detectó un aumento de aparición de cepas resistentes a los aminoglucósidos, concretamente frente a la neomicina que sufre un incremento considerable del año 2011 al 2013 (16,7 % a 57,1% respectivamente). La aparición de cepas resistentes a antimicrobianos ha limitado las opciones terapéuticas para combatir infecciones bacterianas en avicultura. La concienciación por este hecho por parte del sector avícola y la sensibilidad en la utilización de antibióticos por motivos de Salud Pública, ha llevado a la implantación de acciones preventivas en la cadena de producción avícola que han sustituido, en gran parte, la utilización de los antimicrobianos.

Palabras claves: resistencias; *Escherichia coli*; antimicrobianos.

Escherichia coli is one of the most widely distributed microorganisms in poultry, affecting birds of all ages and categories. Phenotypic characterization by susceptibility testing of *E. coli* strains can be useful in order to choose the best treatment in poultry production and will allow monitoring the evolution of bacterial resistance in recent years. Therefore, the aim of this study was to analyze the susceptibility testing results of 2623 *E. coli* strains isolated from birds from 1998 to 2013. A high number of antimicrobial resistant strains were obtained. The main resistance was to enrofloxacin, doxycycline and amoxicillin. While the first two antimicrobials showed an increase in the frequency of resistant strains in the last five years, resistance to amoxicillin remain high throughout the years (70.4% of strains tested). An increasing number of resistant strains to aminoglycosides, specifically to neomycin, was observed from 2011 to 2013 (16.7% to 57.1% respectively). The emergence of drug resistant strains has limited the therapeutic options to treat bacterial infections in poultry. The awareness of this factor on behalf of the poultry sector and the increasing sensitivity towards the use of antibiotics due to Public Health has led to the implantation of preventive measures in the chain of poultry production which have substituted, in large part, the use of antimicrobial agents.

Keyword: resistences; *Escherichia coli*; antimicrobials

Introducción

Escherichia coli es una de las especies microbianas más ampliamente distribuidas en avicultura,

se encuentra en el aparato digestivo de la mayoría de los animales y del hombre formando parte de su microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa (Margall et al., 1997). Puede causar una enfermedad llamada colibacilosis aviar. Esta enfermedad supone un serio problema en avicultura provocando importantes pérdidas económicas, debido a su elevada frecuencia de presentación, a la mortalidad animal que genera, la disminución de los índices productivos y a los costes en tratamientos (Barnes et al., 2003; Vandekerchove et al., 2004). La antibioterapia es el tratamiento de elección. Hoy en día este tratamiento puede presentar ciertas limitaciones e incluso resultar ineficaz debido a la presencia de resistencias a los antimicrobianos. La caracterización fenotípica mediante antibiogramas de aislados de *E. coli* es una herramienta útil para el sector avícola a la hora de elegir el tratamiento más eficaz.

El objetivo de este estudio fue analizar los resultados obtenidos de antibiogramas realizados en 2623 cepas de *E. coli* aisladas en aves desde el año 1998 al 2013. Este análisis permitirá monitorizar la evolución de las resistencias bacterianas en el sector avícola en los últimos años.

Materiales y métodos

Los aislados de *E. coli* se obtuvieron de muestras de aves de casos clínicos sospechosos de colibacilosis que fueron enviadas directamente por nuestros clientes o bien fueron tomadas en el departamento de necropsias del CESAC durante el estudio *postmortem* desde el año 1998 al 2013. Para el estudio de la sensibilidad “in vitro” de los aislados se realizaron antibiogramas mediante la técnica de difusión en disco. Se expusieron a las siguientes familias de antimicrobianos: fluoroquinolonas (enrofloxacina), tetraciclinas (doxiciclina), penicilinas (amoxicilina), aminoglucósidos (gentamicina y neomicina), combinación lincomicina-espectinomomicina y polimixinas (colistina). Se consideró a un aislado sensible, intermedio o resistente a un determinado antimicrobiano en función de los criterios CLSI y EUCAST.

Se realizó el análisis de resultados de los antibiogramas de *E. coli* a través de la Base de datos del CESAC. En la tabla 1 se detalla información relativa al número de aislados testados por año y tipo de ave.

Tabla 1. Relación de muestras analizadas.

Tipo Ave	Año						Número registros
		Pollos	Ponedoras	Reproductoras	Perdices	Otras aves	
	1998	148	22	56	26	21	273
	1999	100	15	43	6	11	175
	2000	76	16	42	14	51	199
	2001	109	12	32	3	20	176
	2002	68	36	26	21	22	173
	2003	139	26	34	54	25	278
	2004	70	29	41	59	32	231
	2005	88	39	36	49	24	236
	2006	69	41	39	47	13	209
	2007	65	34	35	23	27	184
	2008	56	34	10	21	29	150
	2009	62	14	20	9	4	109
	2010	46	9	19	5	0	79
	2011	30	5	11	5	9	60
	2012	30	4	15	14	7	70
	2013	5	2	5	4	5	21
Total		1161	338	464	360	300	2623

Resultados

Se obtuvo un elevado número de aislados de *E. coli* resistentes a antibióticos de uso en veterinaria. Las principales resistencias se observaron frente a enrofloxacin, doxiciclina y amoxicilina. El porcentaje de aislados resistentes presento variación en función del antimicrobiano estudiado (0 - 81 % de aislados resistentes) Por ello a continuación se detallan los resultados obtenidos para cada antibiótico incluido en el estudio.

Fluoroquinolonas (Enrofloxacin)

Se obtuvo un elevado porcentaje de aislados resistentes a la enrofloxacin (49% (28 - 70,6%)). Las resistencias aumentaron en el año 2007, donde más del 50% de los aislados presentó resistencia frente a este antibiótico, este incremento se mantiene hasta la actualidad, siendo el año 2009 el año con mayor porcentaje de cepa resistentes (70,6%) (Figura 1).

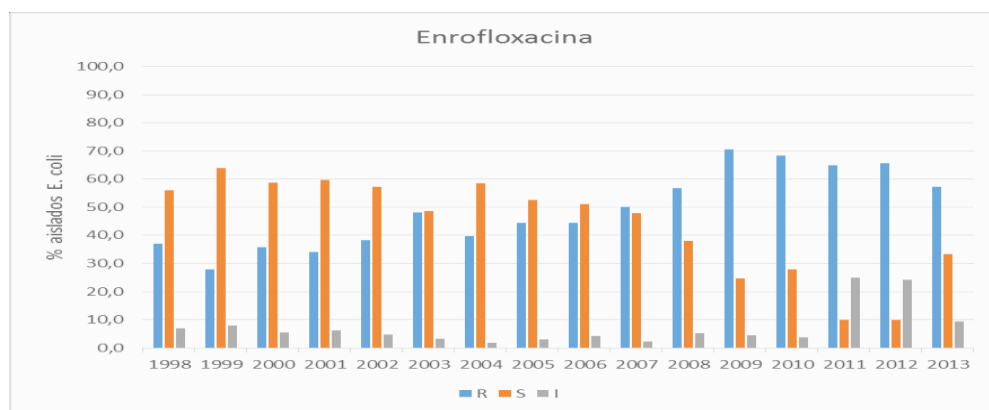


Figura 1. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes, sensibles o intermedios a enrofloxacin en función del año. R: resistente; S: sensible; I: intermedio.

Los pollos fueron las aves con mayor número de resistencias, sufriendo un incremento considerable en el año 2009 donde más el 51,4% de estas aves mostró resistencia a la enrofloxacin. En los últimos años se ha producido un aumento sostenido de la resistencia a enrofloxacin en reproductoras con porcentajes de entorno al 10%. En perdices los años con mayor número de resistencias fueron del 2003 al 2006. Sin embargo en ponedoras la presencia de cepas resistentes es escasa, del año 2011 al 2013 no se han detectado resistencias a enrofloxacin en estas aves (Figura 2).

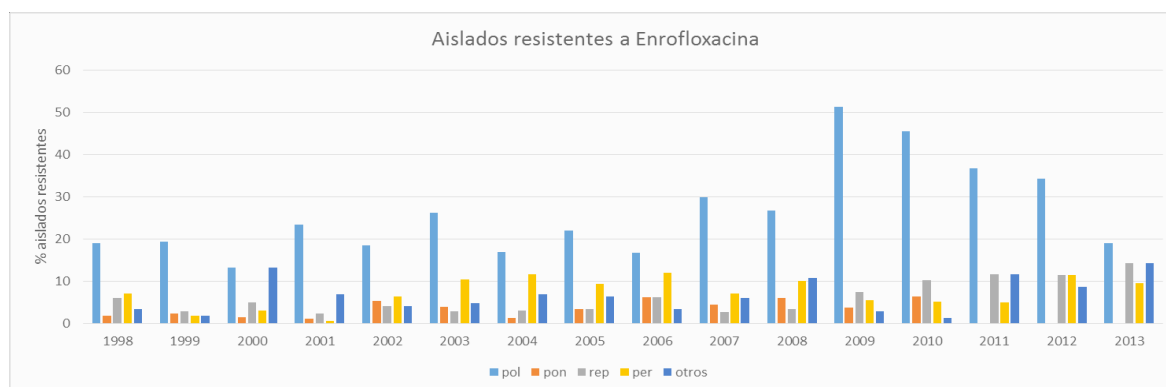


Figura 2. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a enrofloxacin en función del tipo de ave. Pol: pollos; Pon: ponedoras; Rep: reproductoras; Per: perdices; Otros: otras especies de aves.

Tetraciclinas (Doxiciclina)

De los 2623 aislados de *E. coli* analizados, 1355 presentaron resistencia frente a la doxiciclina. El porcentaje de resistencias se mantiene elevado por encima del 39% a lo largo de todos los años, siendo los años 2003, 2004 y 2005 los que presentaron menor número de cepas resistentes (39,9 %, 41,6 % y 41,1 % respectivamente) (Figura 3).

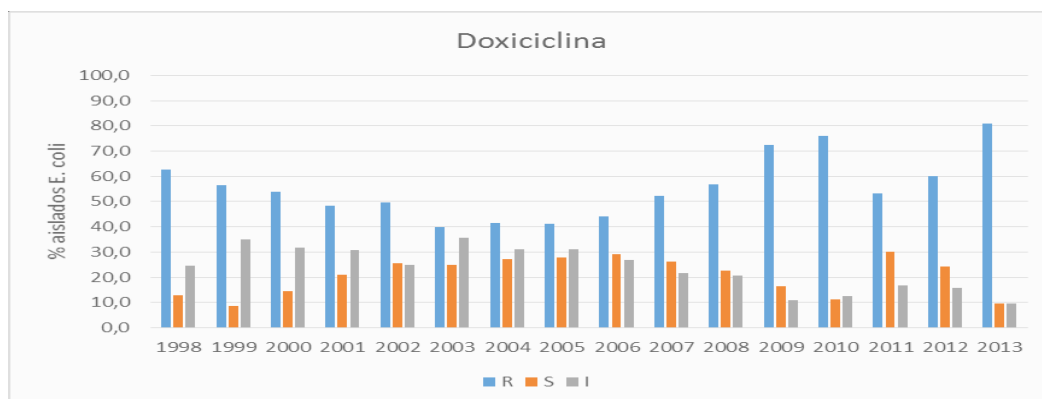


Figura 3. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes, sensibles o intermedios a doxiciclina en función del año. R: resistente; S: sensible; I: intermedio.

Los pollos son las aves con mayor frecuencia de aislados resistentes a lo largo de todos los años, excepto en el año 2013, en este último año solo se realizaron 5 antibiogramas en pollos. La media anual de cepas resistentes en ponedoras es aproximadamente del 6% excepto en el año 2008 con un 14,7 % de aislados resistentes a doxiciclina. Posteriormente al 2008 el número de registros de antibiogramas en ponedoras desciende por lo que no sabemos si el incremento en resistencias se debe a un aumento puntual o si realmente las resistencias han aumentado en estas aves a lo largo de los años. En reproductoras la frecuencia de cepas resistentes que encontramos en 2012 y 2013 es muy similar a las detectadas en 1998, 1999 y 2000, son de entre el 10 al 20 %. En perdices se produce un incremento en el número de resistencias en los años 2004, 2005 y 2006 esto es debido muy probablemente a un incremento en el número de antibiogramas realizados en estas aves (Figura 4).

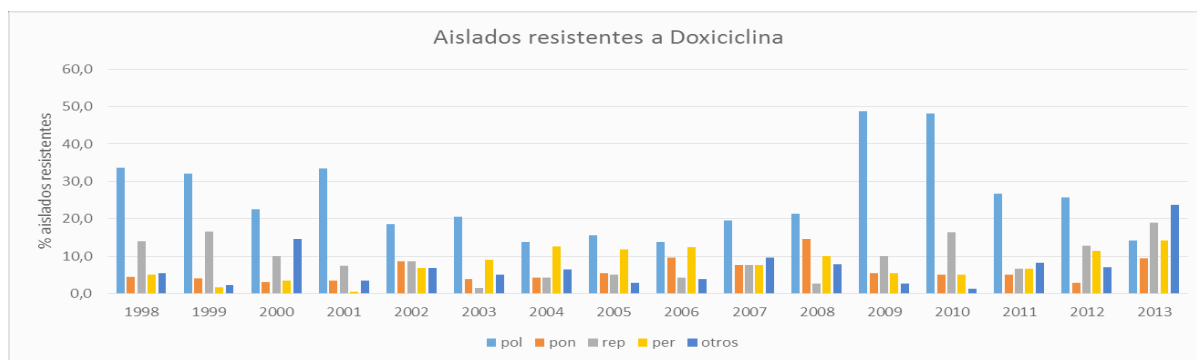


Figura 4. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a doxiciclina en función del tipo de ave. Pol; pollos; Pon: ponedoras; Rep: reproductoras; Per: perdices; Otros: otras especies de aves.

Penicilinas (Amoxicilina)

La amoxicilina es el antibiótico con mayor número de aislados de *E. coli* resistentes 70,4% (64.6-81.0%) a lo largo de todos los años estudiados. El 28,7% (15.0 - 35,4 %) de los aislados estudiados fue sensible y el porcentaje de cepas intermedias fue del 0,91% (0 – 10,0 %) (Figura 5).

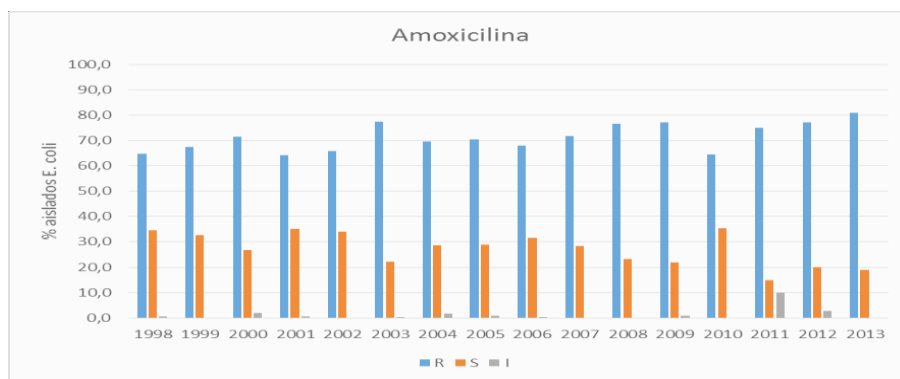


Figura 5. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes, sensibles o intermedios a amoxicilina en función del año. R: resistente; S: sensible; I: intermedio.

En cuanto al tipo de aves, los pollos son los portadores de mayor número de resistencias 34,2 % (25,5 - 49,5%). También se detectaron resistencias en reproductoras y ponedoras, 12,1 % (5.3-19%) y 6,0% (2.9-12.7%) respectivamente (Figura 6). Cabe destacar que el 28,2 % de los aislados resistentes detectados en el año 2000 pertenecían a codornices.

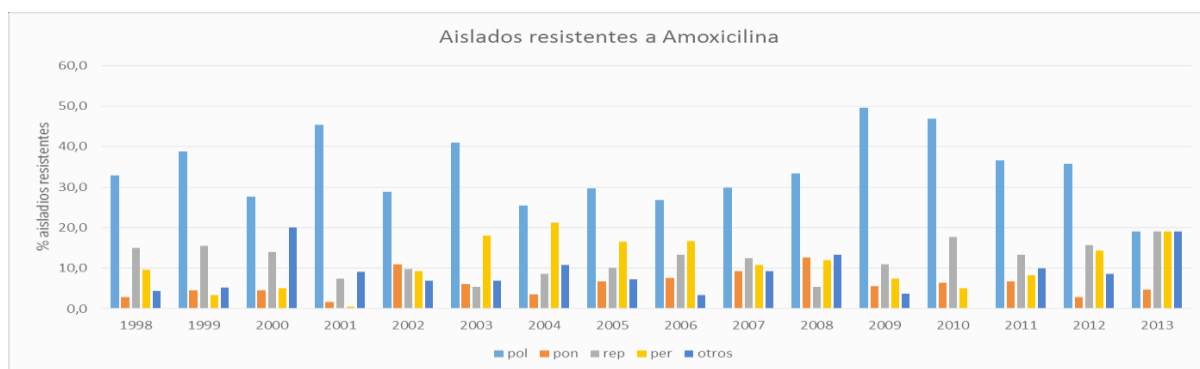


Figura 6. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a amoxicilina en función del tipo de ave. Pol; pollos; Pon: ponedoras; Rep: reproductoras; Per: perdices; Otros: otras especies de aves.

Aminoglucósidos (Gentamicina, Neomicina)

Gentamicina

Encontramos mayor número de cepas sensibles (1890 cepas (72,1%)) que resistentes (424 cepas (16,2%)). En el año 2007 se produce un aumento en la detección de resistencias (27,7 %) alcanzando su nivel máximo en el 2013 con un 42,9 % de cepas resistentes (Figura 7).

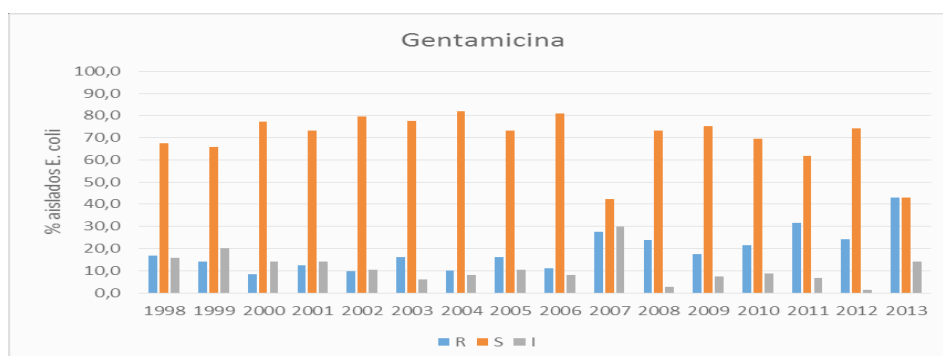


Figura 7. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes, sensibles o intermedios a gentamicina en función del año. R: resistente; S: sensible; I: intermedio.

La mayoría de estas resistencias son detectadas en pollos y perdices, mientras que en ponedoras y reproductoras la frecuencia es muy baja, 1,0% y 1.8% respectivamente (Figura 8).

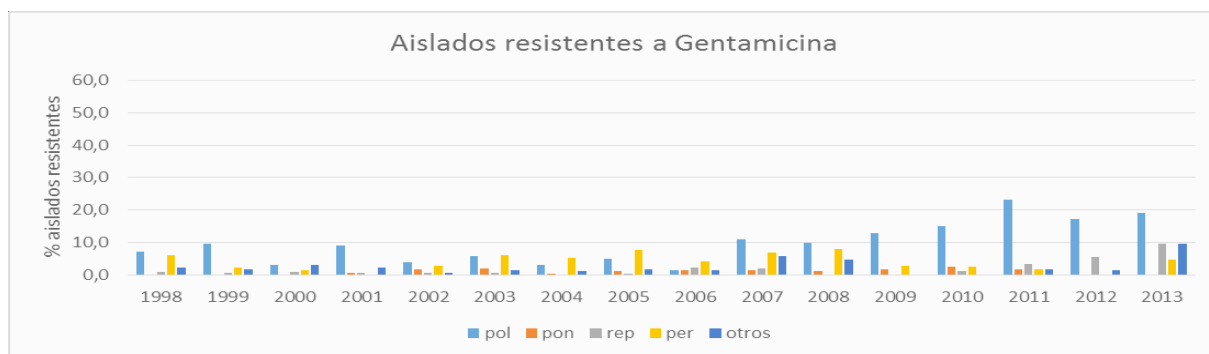


Figura 8. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a gentamicina en función del tipo de ave. Pol; pollos; Pon: ponedoras; Rep: reproductoras; Per: perdices; Otros: otras especies de aves.

Neomicina

Más del 60 % de las cepas de *E. coli* fueron sensibles a la neomicina. El 12,5 % de ellas mostró resistencia aumentando este porcentaje en 2013 con un 57,1 % de aislados resistentes (Grafico 11). A excepción de las aves ponedoras ha habido un aumento de cepas resistentes en pollos, reproductoras y perdices en este último año, donde encontramos la misma frecuencia de aislados resistentes en estos tres tipos de aves (14,3 %). Mientras que en pollos el aumento ha sido gradual del año 2010 al 2013, en perdices y reproductoras este aumento se produce en el año 2013 (Figura 9).

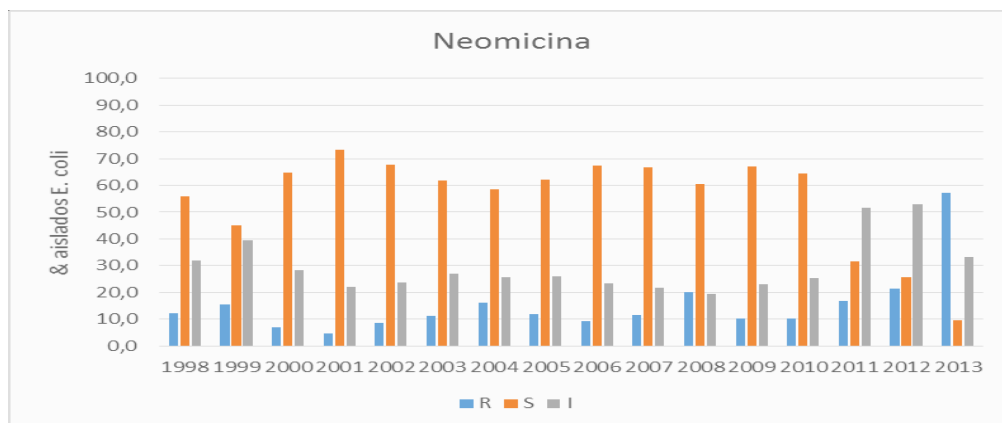


Figura 9. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes, sensibles o intermedios a neomicina en función del año. R: resistente; S: sensible; I: intermedio.

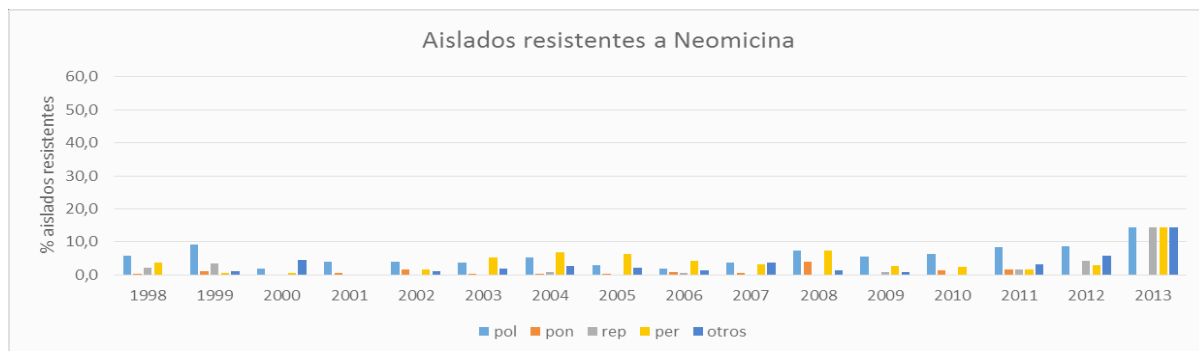


Figura 10. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a neomicina en función del tipo de ave. Pol; pollos; Pon: ponedoras; Rep: reproductoras; Per: perdices; Otros: otras especies de aves.

Combinación lincomicina-espectinomicina

El 80.4 % de las cepas de *E. coli* resultaron sensibles a lincomicina-espectinomicina, únicamente 216 aislados (8.2%) presentaron resistencia, el resto de cepas (11.4%) mostraron resistencia intermedia frente a este antimicrobiano (Figura 11).

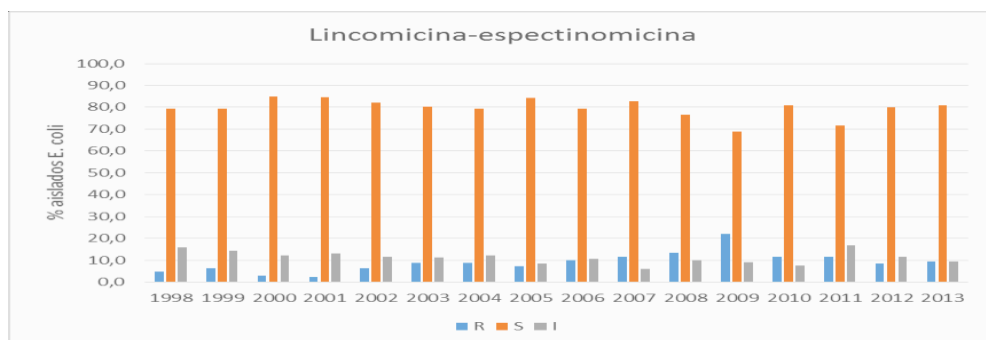


Figura 11. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes, sensibles o intermedios a lincomicina-espectinomicina en función del año. R: resistente; S: sensible; I: intermedio.

La frecuencia de aislados resistentes en aves ponedoras y reproductoras fue muy baja 0.3 % y 0.8 % respectivamente. El porcentaje de cepas resistentes más elevado se detectó en pollos en el año 2009 (18,3 %) posteriormente descendiendo gradualmente hasta el año 2012 (1,4 %). En perdices el 2.5 % de los aislados de *E. coli* analizados fueron resistentes a la lincomicina-espectinomicina (Figura 12).

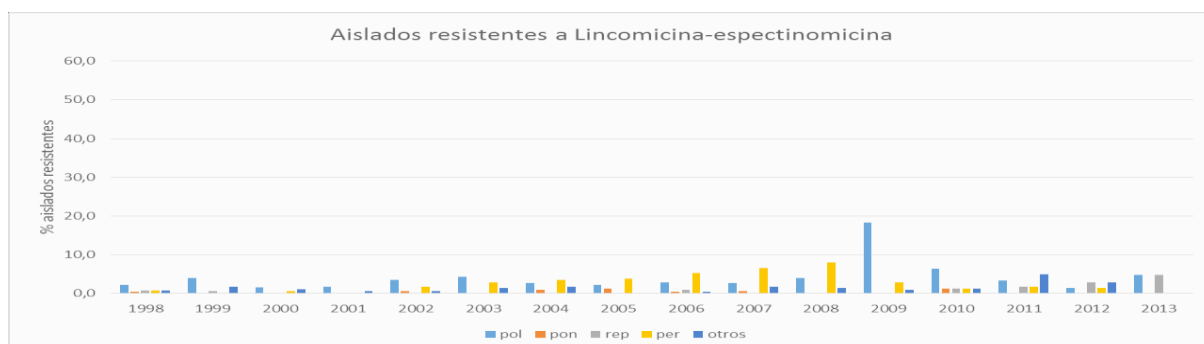


Figura 12. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a lincomicina-espectinomicina en función del tipo de ave. Pol; pollos; Pon: ponedoras; Rep: reproductoras; Per: perdices; Otros: otras especies de aves.

Polimixinas (Colistina)

La colistina es el antimicrobiano con menor número de cepas resistentes detectadas (2,5%), El número de aislados resistentes detectados anualmente fue inferior a 5, a excepción del año 2008 con 13 aislados de *E. coli* resistentes más de la mitad de ellos detectados en ponedoras. Cabe señalar que en los años 2000 y 2001 no fue detectada ninguna cepa resistente (Figuras 13 y 14). En los últimos tres años el porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia han aumentado progresivamente, pasando de un 13,9 % en 2010 a porcentajes superiores al 42 % en los años 2011, 2012 y 2013.

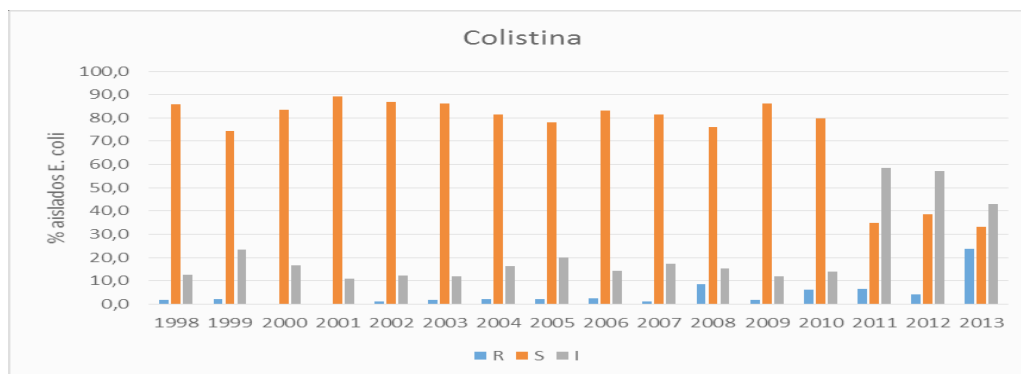


Figura 13. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes, sensibles o intermedios a colistina en función del año. R: resistente; S: sensible; I: intermedio.

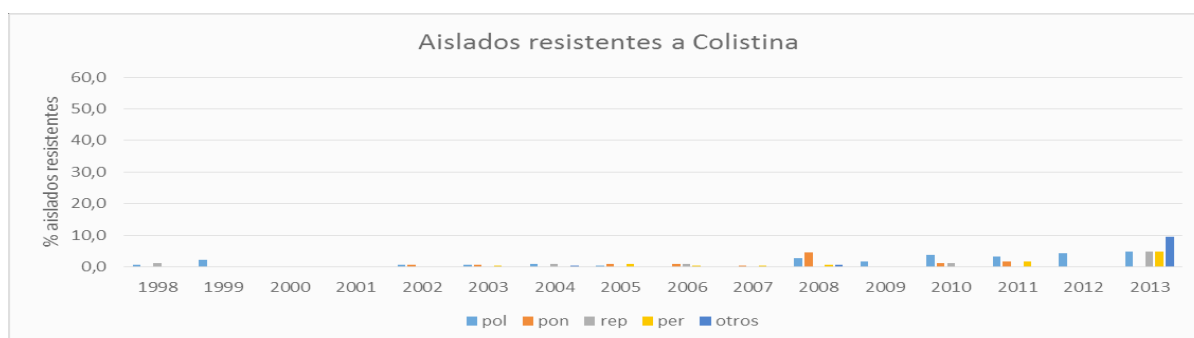


Figura 14. Frecuencia de aislados de *E. coli* resistentes a colistina en función del tipo de ave. Pol; pollos; Pon: ponedoras; Rep: reproductoras; Per: perdices; Otros: otras especies de aves.

Discusión

Las principales resistencias se observaron frente a enrofloxacina, doxiciclina y amoxicilina, tres antimicrobianos de amplio espectro activos contra una amplia gama de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Schappinger and Hiller 1996; Ball, 2000). Su amplio uso como agentes terapéuticos en medicina humana y veterinaria a lo largo de los años ha provocado la selección y la aparición de resistencias bacterianas a estos antibióticos (Speed *et al.*, 1992; Liam *et al.*, 2014).

La gran capacidad de adaptación bacteriana a las terapias actuales y la falta de aparición de nuevas familias de antibióticos eficaces han convertido a la resistencia bacteriana en un fenómeno mundial de gran importancia en veterinaria y Salud Pública. Son por lo tanto de gran utilidad los esfuerzos que está haciendo el sector avícola invirtiendo cada vez más en medidas de prevención y de bioseguridad para conseguir así limitar en gran medida el uso de antimicrobianos. Además, en un intento para mantener la eficacia de los antimicrobianos ya existentes se han creado una serie de pautas y directrices (<http://publications.nice.org.uk/antibiotic-prescripción-especialmente-quinolonas-y-cefalosporinas--ktt9-pruebas-contexto>) (www.agemed.es).

Se está trabajando en la investigación de nuevos antimicrobianos a través del conocimiento adquirido de los antimicrobianos actuales y de la incorporación de la genómica en la investigación de nuevas dianas, de fuentes de productos naturales no explorados y de nuevas tecnologías de síntesis. Conocer los mecanismos implicados en estas resistencias permitirá optimizar la vigilancia de resistencia y las políticas de control y uso de antibióticos a nivel nacional.

Referencias

AMARA, A., ZAKIA, Z. and BOUZOUBAA, K. (1995). Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Veterinary Microbiology* **43**:325-330.

- BALL, P.** (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**:17–24.
- BARNES, H. J., VAILLANCOURT, J. P. and GROSS, W. B.** (2003). Colibacillosis. *Diseases of Poultry*, 11th Edition, Section II, Chapter 18.
- BLANCO, J.E., BLANCO, M., MORA, A. and BLANCO, J.** (1997). Prevalence of Bacterial Resistance to quinolones and other antimicrobials among Avian *Escherichia coli* strain isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *Journal of clinical Microbiology* **35**:2184-2185.
- GEORNARAS, I., HASTINGS, J. W. and VON HOLY, A.** (2002). Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (9): 4698.
- MARGALL, N., DOMÍNGUEZ, A., PRATS, G. and SALLERAS, L.** (1997). *Escherichia coli* Enterohemorrágico. *Revista Española de Salud Pública* **71**: 437-443.
- REDGRAVE, L.S., SUTTON, S.B., WEBBER, M.A. and PIDDOCK, L.J.** (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology* **22**: 438-445.
- SCHAPPINGER, D. and HILLEN, W.** (1996) Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology* **165**:359–369.
- SPEER, B.S., SHOEMAKER, N.B. and SALYERS, A.A.** (1992) Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, **5**: 387–399.
- VANDEKERCHOVE, D., DE HERDT, P., LAEVENS, H. and PASMANS, F.** (2004). Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathology* **33**:117-125.