



# Diversidad de cepas de *Escherichia coli* multirresistentes y con genes de virulencia causantes de brotes de colibacilosis en aves en España durante el año 2012

Marc Solà Ginés<sup>1</sup>, Karla Cameron Veas<sup>1</sup>, Ignacio Badiola<sup>1,3</sup>, Roser Dolz<sup>1</sup>, Natalia Majó<sup>1,4</sup>, Ghizlane Dahbi<sup>2</sup>, Susana Viso<sup>2</sup>, Azucena Mora<sup>2</sup>, Jorge Blanco<sup>2</sup> and Lourdes Garcia-Migura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain. <sup>3</sup>Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

marc.sola@cresa.uab.cat

## Introduction and Objectives

*Escherichia coli* patogénica aviar (APEC) es la causa más importante de colibacilosis en la producción de aves de corral. Los antimicrobianos son el tratamiento común para la colibacilosis aviar. Sin embargo, durante los últimos años se han documentado incrementos en las resistencias (Yang *et al.*, 2004). Varios estudios han sugerido que los aislados de APEC son patógenos zoonóticos potenciales (Ewers *et al.*, 2004), así como la transmisión por plásmidos de genes de resistencia entre cepas de aves y humanos (Smet *et al.*, 2011). Adicionalmente, aún no se conoce la correlación entre genes de virulencia y de resistencia en APEC. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente cepas de *E. coli* (n=22) obtenidas de 13 granjas distribuidas por España afectadas por colibacilosis entre enero y marzo del 2012, y compararlas con cepas de *E. coli* (n=10) aisladas de heces de animales sanos (AFEC).

## Materials and Methods

### Aislamiento

Un total de 22 muestras provenientes de hispos cloacales y de tejidos del tracto respiratorio tomadas de animales con colibacilosis fueron sembradas en agar MacConkey. Una colonia por placa fue seleccionada y confirmada como *E. coli* (Heninger *et al.*, 1999). Adicionalmente, 10 cepas de *E. coli* de origen fecal (AFEC) aisladas de animales sanos fueron analizadas como muestras control.

### Serotipado y filogenia

La determinación de los antígenos O y H se llevó a cabo por un método descrito por Guinée *et al.* (1981). Los aislados fueron discriminados en grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) de acuerdo con el método descrito previamente por Clermont *et al.* (2000).

### Electroforesis en campo pulsado

XbaI-electroforesis en campo pulsado (PFGE) fue utilizada para determinar la relación genética entre los aislados (Ribot *et al.*, 2006). Los resultados fueron analizados por Fingerpringing II Informatix (Applied Maths).

### Detección de genes de virulencia

La presencia de siete genes de virulencia (*iroN*, *iss*, *ompT*, *hlyF*, *iutA*, *colV*, *east1*) asociados a cepas APEC fue analizada por PCR.

### Tests de sensibilidad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a 14 antimicrobianos fue determinada por métodos de microdilución (VetMIC GN-mo, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden). Los resultados fueron interpretados de acuerdo con la guía EUCAST.

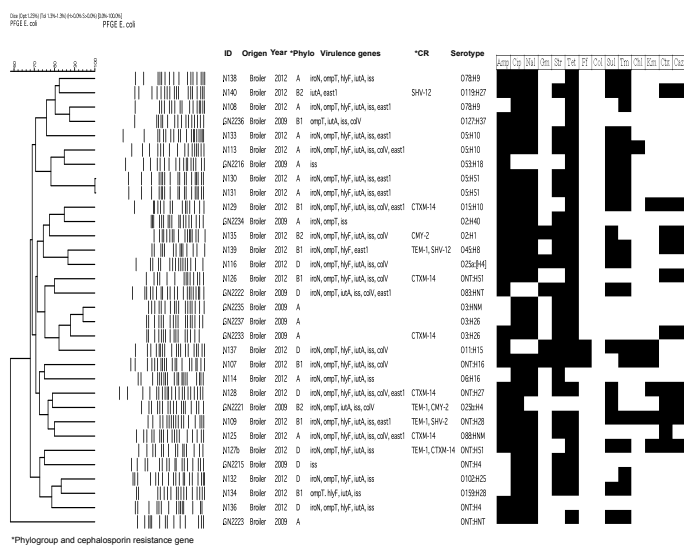
### Determinantes resistentes a antibióticos

La resistencia a cefalosporinas fue evaluada por PCR para los siguientes genes: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>CMY-1</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> (Hasman *et al.*, 2005).

## Results

- Veintitrés de las cepas se han podido serotipar con los antisueros O y H. Un total de 17 serogrupos O y 15 antígenos flagelares H han sido identificados en diferentes combinaciones (Figura 1). Entre las cepas APEC, dos pertenecían al filoserotipo altamente patogénico O78:H9-A, y cuatro al filoserotipo O5-A. Adicionalmente, el clon emergente O25:H4-B2-ST131 fue detectado en un aislado AFEC, el cual mostraba resistencia a cefalosporinas (*bla*<sub>CMY-2</sub>).
- La mayoría de los aislados pertenecían al filogrupo A. Entre los aislados de APEC, el 36%, 32%, 5% y 27% pertenecían a los filogrupos A, B1, B2 and D, respectivamente. Para las cepas AFEC, el 60%, 10%, 10% y 20% pertenecían a los filogrupos A, B1, B2 y D, respectivamente.
- XbaI-PFGE análisis mostraron un elevado grado de diversidad genética. Treinta y un perfiles de restricción diferentes fueron identificados de entre 32 aislados (Figura 1). Sólo dos de ellos presentaron el mismo perfil de PFGE y pertenecían a la misma granja.
- De los 22 aislados de APEC, el 95%, 95%, 91%, 91%, 95%, 50% y 36% contenían los genes de virulencia *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT*, *east1* y *colV*, respectivamente. Por el contrario, el 30%, 0%, 60%, 30%, 40%, 10% y 30% de las 10 cepas AFEC fueron positivas para dichos genes (Figura 1). La presencia de los genes de virulencia en las cepas AFEC fue menor en general.
- Los tests de sensibilidad antimicrobiana detectaron 11 cepas resistentes a cefalosporinas. Estudios de secuenciación confirmaron que seis cepas contenían los genes *bla*<sub>CTXM-14</sub>, dos *bla*<sub>SHV-12</sub>, una *bla*<sub>SHV-2</sub> y dos *bla*<sub>CMY-2</sub>.

Figura 1: Dendrograma ilustrando la relación genotípica y fenotípica de las cepas, filogenia, genes de virulencia y de resistencia a cefalosporinas y serotipado.



\*Phylogroup and cephalosporin resistance gene

Am: Ampicilin (WTS8mg/L); C: Ciprofloxacina (WTS0.064mg/L); Nal: Nalidixic acid (WTS16mg/L); Gm: Gentamicin (WTS2mg/L); Sm: Streptomycin (WTS16mg/L); Tc: Tetracyclina (WTS8mg/L); Ff: Fluorfenicol (WTS16mg/L); Cs: Colistin (WTS2mg/L); Su: Sulphametoxazole (WTS64mg/L); Tm: Trimethoprim (WTS2mg/L); Cm: Chloramphenicol (WTS16mg/L); Km: Kanamicina (WTS8mg/L); Ctx: Cefotaxime (WTS0.25mg/L); Caz: Ceftazidime (WTS0.5mg/L).

- La resistencia a ciprofloxacina se observó en un 91% de los aislados, mientras que un 81% fueron resistentes a ácido nalidixico con una MIC  $\geq$  128 mg/L. Todas las cepas analizadas fueron multirresistentes, incluyendo aquellos aislados de animales sanos. Además, un 50% de los aislados mostraron resistencia a más de ocho antimicrobianos. Por otra parte, el 91% de las cepas fueron resistentes a tetraciclina, 78% a ampicilina, 69% a estreptomicina, 63% a sulfametoxazol, 59% a trimetoprim, 34% a cefotaxime, 31% a ceftazidime, 19% a kanamicina, 16% a gentamicina, 13% to cloranfenicol y 6% a florfenicol.

## Conclusion

- Las cepas de *E. coli* causantes de brotes de colibacilosis en distintas explotaciones durante el 2012 fueron originados por cepas no relacionadas genéticamente.
- Las cepas analizadas contenían una gran cantidad de genes de virulencia. Aunque el número de cepas es limitado, parece que la frecuencia de genes de virulencia en cepas APEC es más elevada que en AFEC.
- Once de los 32 aislados fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación, conteniendo tres familias diferentes de genes de resistencia, generalmente asociados a elementos genéticos móviles.
- Este estudio demuestra una gran diversidad de poblaciones de *E. coli* multirresistentes, tanto en cepas APEC como aislados de AFEC. Las aves de corral son un reservorio de cepas con genes de resistencia que potencialmente pueden transmitirse a través de la cadena alimentaria. Estudios epidemiológicos adicionales son necesarios para identificar grupos clonales y mecanismos de resistencia con relevancia para la salud pública.

## References

Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *App. Environ. Microbiol.* 66 (10): 4555-4558.

Ewers, C., Janben, T., Kiebling, S., Philipp, H.-C. and Wieler, L.H. (2004). Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104: 91-101.

Guinée, P.A.M., Jansen, W.H., Wadström, T. and Sellwood, R. (1981). *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.* 13: 126-162.

Hasman, H., Mewis, D., Veldman, K., Olesen, I. and Aarestrup, F.M. (2005).  $\beta$ -Lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 115-121.

Heninger, A., Binder, M., Schmidt, S., Unertl, K., Botzenhart, K. and Döring, G. (1999). PCR and Blood Culture for Detection of *Escherichia coli* Bacteremia in Rats. *J. Clin. Microbiol.* 37 (8): 2479-2482.

Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B. and Barrett, T.J. (2006) Standardization of Pulse-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3: 59-67.

Smet, A., Rassechaert, G., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Butaye, P., Catry, B., Haesebrouck, F., Herman, L. and Heyndrickx, M. (2011). In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *J. App. Microbiol.* 110 (2): 541-549.

Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R. and Meng, J. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Disease Chickens and Swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 42 (8): 3483-3489.

Acknowledgements: This project (AGL2011-28836) was partially funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN)