

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

M. SOLÀ GINÉS^{1*}, K. CAMERON VEAS¹, I. BADIOLA^{1,3}, R. DOLZ¹, N. MAJÓ^{1,4}, G. DAHBI², S. VISO², A. MORA², J. BLANCO² y L. GARCÍA-MIGURA¹

¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. ²Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain. ³Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain. ⁴Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Spain.

*Corresponding author: marc.sola@cresa.uab.cat

La colibacilosis aviar es una enfermedad sistémica causada por cepas de *Escherichia coli* patogénica aviar (APEC). El objetivo de este estudio fue caracterizar cepas de *E. coli* (n=22) obtenidas de 13 granjas, distribuidas por diferentes provincias de España afectadas por colibacilosis durante el año 2012, y compararlas con cepas de *E. coli* (n=10) aisladas de heces de animales sanos (AFEC). Para ello se llevó a cabo el serotipado, detección de genes de virulencia, análisis de grupos filogenéticos, campo pulsado (PFGE) y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a 14 antimicrobianos. Finalmente, se detectaron los genes de resistencia a cefalosporinas. De aquellos aislados causantes de colibacilosis, el 95%, 95%, 91%, 91%, 95%, 50% y 36% cepas fueron positivas para los genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT*, *east1* y *colV* respectivamente, mientras que en las cepas AFEC hubo 30%, 0%, 60%, 30%, 40%, 10% y 30% positivas para dichos genes. En los grupos filogenéticos se observó una gran variedad entre las diferentes cepas: 36% del grupo A, 32% del B1, 5% del B2 y 27% del D entre las APEC, y 60% del grupo A, 10% del B1, 10% del B2 y 20% del D entre las AFEC. El análisis de serogrupos dentro de las APEC detectó dos cepas del serotipo clásico altamente patogénico O78:H9-A y cuatro cepas del serogrupo O5-A. También se detectó entre las cepas comensales un aislado del clon emergente O25b:H4-B2-ST131 resistente a cefalosporinas (*bla*_{CMY-2}). Los perfiles obtenidos mediante PFGE revelaron la presencia de distintos clones incluso dentro de la misma granja. Los estudios de CMIs detectaron 11 cepas resistentes a cefalosporinas, seis de la familia *bla*_{CTX-M}, tres *bla*_{SHV} y dos *bla*_{CMY-2}. Todas las cepas analizadas fueron multirresistentes. Este estudio demuestra gran diversidad de poblaciones de *E. coli* multirresistentes entre cepas aisladas de casos de colibacilosis y cepas comensales. Finalmente, demuestra que las aves son un reservorio de cepas con numerosos genes de virulencia, así como de genes de resistencia que potencialmente pueden transmitirse a través de la cadena alimentaria, resaltando su relevancia para la salud pública.

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) are the major cause of colibacillosis in poultry production. The objective of this study was to characterize highly pathogenic *E. coli* (n=22) causing colibacillosis isolated from 13 different broiler farms throughout Spain, and compare them to avian faecal *E. coli* (AFEC) strains obtained from healthy animals (n=10). All isolates were serotyped by biochemical methods. Virulence genes and analysis of phylogenetic groups were performed by multiplex PCR. The clonality of isolates was assessed by pulse field gel electrophoresis (PFGE). Antimicrobial susceptibility testing was carried out as minimal inhibitory concentration (MIC) to fourteen different antimicrobials. Isolates showing microbiological resistance to cephalosporins were analysed for the presence of resistance genes of the *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CMY} families. Out of 22 APEC isolates, 95%, 95%, 91%, 91%, 95%,

50% and 36% contained the virulence genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *ironN*, *ompT*, *east1* and *colV*, respectively. Additionally, 30%, 0%, 60%, 30%, 40%, 10% and 30% of the 10 AFEC strains were positive for these genes. The analysis of phylogenetic groups detected 36%, 32%, 5% and 27% of the A, B1, B2 and D phylogroups, respectively within the APEC isolates. For the AFEC, 60%, 10%, 10% and 20% belonged to the A, B1, B2 and D phylogroups, respectively. Serotyping techniques detected two strains of the highly pathogenic serogroup O78:H9-A, and four strains from serogroup O5-A within the APEC isolates. Additionally, the emergent clone O25b:H4-B2-ST131 was detected in an AFEC isolate which also exhibited resistance to cephalosporins (*bla*_{CMY-2}). PFGE analysis found a high degree of genetic polymorphism among the *E. coli* isolates. MIC test detected 11 strains resistant to cephalosporins; six *bla*_{CTX-M}, three *bla*_{SHV} and two *bla*_{CMY-2}. In addition, 91% of the isolates were microbiologically resistant to ciprofloxacin (wild type ≤ 0.064 mg/L) and 88% to nalidixic acid with MIC ≥ 128 mg/L. All the analyzed strains were multi-resistant, including those isolated from healthy animals. This study demonstrates a very diverse population of multi-drug resistant *E. coli* containing a high number of virulent genes. Broilers are a reservoir of resistance genes that can be transmitted into the community through the food chain. More epidemiological studies are necessary to identify clonal groups and resistance mechanisms with potential relevance to public health.

Keywords: Escherichia coli; APEC; serotipado; genes virulencia; resistencia a cefalosporinas

Introduction

Escherichia coli es un comensal del intestino y un patógeno que puede causar infecciones entéricas y extraintestinales en humanos y animales. *E. coli* patógena aviar (APEC) es la causa más importante de colibacilosis en la producción de aves de corral, resultando en grandes pérdidas para la industria debido a la morbilidad y la alta mortalidad.

Varios estudios han sugerido que los aislados de APEC son patógenos zoonóticos potenciales (Ewers *et al*, 2004). Los antimicrobianos son el tratamiento común para la colibacilosis aviar. Durante los últimos años se han documentado incrementos en las resistencias en estos en aislados (Yang *et al*, 2004), así como la transmisión por plásmidos de genes de resistencia entre cepas de aves y humanos (Smet *et al*, 2011). Se ha observado una incompatibilidad entre genes de resistencia y de virulencia especialmente en cepas del grupo filogenético B2 causantes de infecciones urinarias y sepsis en seres humanos (Moreno *et al*, 2006), pero no se ha estudiado suficientemente la correlación entre genes de virulencia y de resistencia en APEC. El objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente cepas de *E. coli* (n=22) obtenidas de 13 granjas distribuidas por diferentes provincias de 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). Esto puede ayudar a identificar clones potencialmente virulentos para desarrollar programas de prevención basados en la vacunación, así como a estimar la relación entre genes de virulencia y resistencias a agentes antimicrobianos.

Materials and methods

Veintidós muestras provenientes de hisopos 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* por métodos de PCR (Heninger *et al*, 1999). Adicionalmente, 10 cepas de *E. coli* de origen fecal aisladas de animales sanos fueron analizadas como muestras control.

La determinación de los antígenos O y H se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (<http://www.lugo.usc.es/ecoli>), por un método descrito por Guinée *et al* (1981).

Los aislados fueron discriminados en grupos filogenéticos (A, B1, B2 o D) de acuerdo con un método descrito previamente por Clermont *et al* (2000). La electroforesis en campo pulsado (PFGE) fue utilizada para realizar el tipado molecular y estudiar la diversidad y la relación genética entre los

aislados. El protocolo utilizado fue el descrito por CDC PulseNet protocol (Ribot *et al*, 2006). Los resultados fueron analizados por el software Fingerprinting II Informatix (Applied Maths).

La presencia de siete genes de virulencia (*iroN*, *iss*, *ompT*, *hlyF*, *iutA*, *colV*, *east1*) típicos de cepas APEC fue analizada por PCR (Johnson *et al*, 2008; Rodríguez-Siek *et al*, 2004; Yamamoto & Echeverria, 1996).

Todos los aislados fueron testados por concentración mínima inhibitoria (CMI) basada en microdilución para los siguientes antimicrobianos: cefotaxin, ceftazidime, ampicilina, estreptomycin, gentamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, flofenicol, tetraciclina, colistina, sulfametoxazol, kanamicina, ácido nalidíxico y trimetoprim. Los resultados fueron interpretados de acuerdo con la guía de EUCAST; *E. coli* ATCC 25922 fue usada como cepa control. En todas aquellas cepas que mostraban resistencia a cefalosporinas se analizó la presencia de los genes *bla_{CTX}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-1}* y *bla_{CMY-2}*, como esta descrito por Hasman *et al* (2005).

Results and discussion

Se aislaron un total de 22 cepas de *E. coli* distribuidas en 13 explotaciones avícolas diferentes, durante el período de enero a marzo del 2012. Adicionalmente, se añadieron al estudio, 10 cepas aisladas durante el 2009 de hisopos cloacales de animales sanos.

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*). Los serogrupos de mayor prevalencia fueron O2 (6%), O3 (6%), O5 (6%) y O78 (6%) entre los serogrupos O; y H4 (13%), H10 (9%), H9 (6%), H26 (6%), H27 (6%), H28 (6%) y H51 (6%) entre los antígenos H. 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_{CMY-2}*).

La mayoría de los aislados pertenecían al filogrupo A. Entre los aislados de APEC, los análisis detectaron un 36% del grupo A, un 32% del grupo B1, un 5% del grupo B2 y un 27% del grupo D. Para las cepas AFEC, el 60%, 10%, 10% y 20% pertenecían a los filogrupos A, B1, B2 y D, respectivamente.

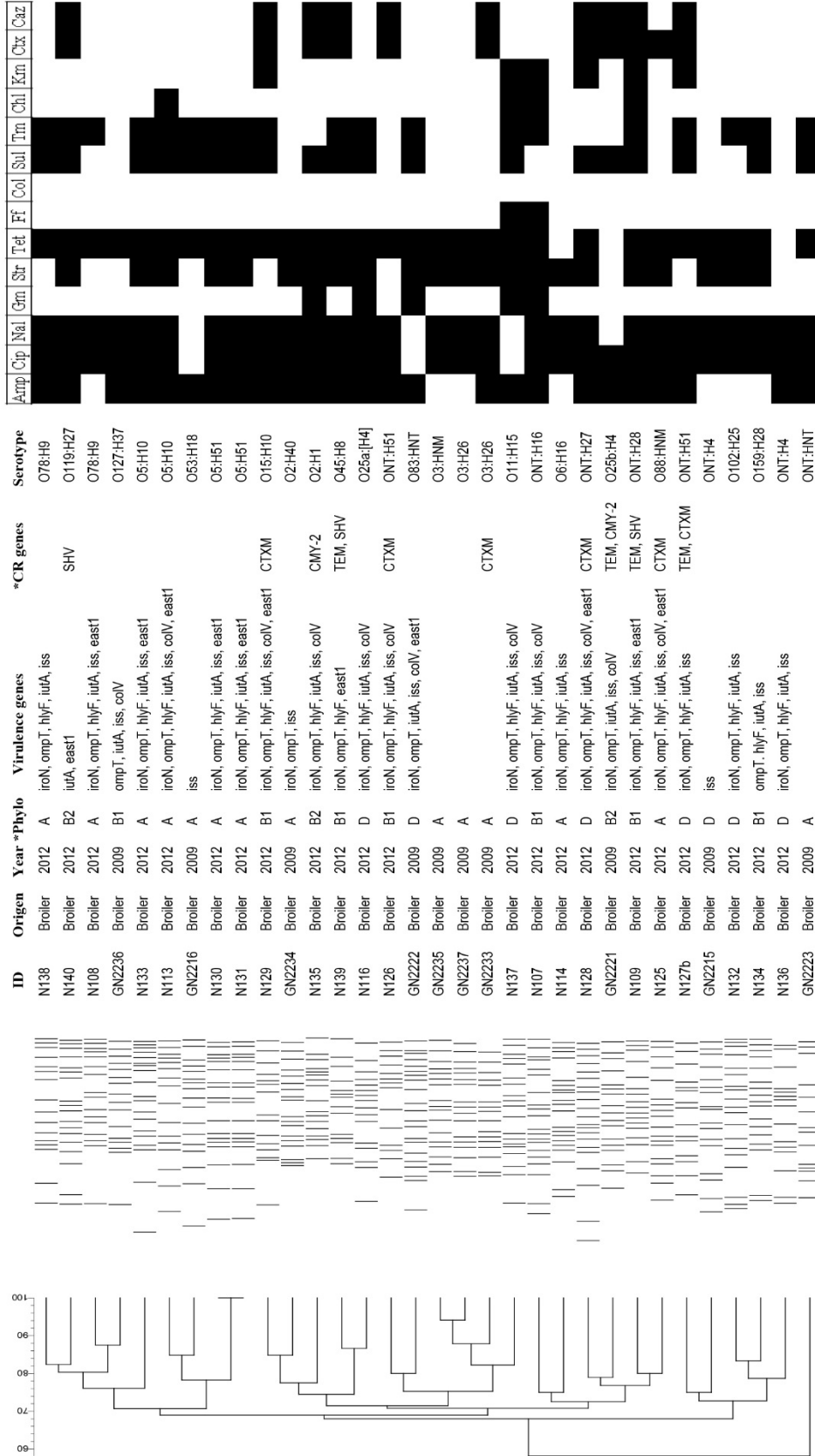
El *XbaI*-PFGE análisis mostró un elevado grado de diversidad genética. El número de fragmentos generados osciló de 14 a 21, y sus tamaños variaron de 33.3Kb a 1135Kb. Treinta y un perfiles de restricción diferentes fueron identificados de entre 32 aislados (*Figura 1*). Sólo dos de ellos presentaron el mismo perfil de PFGE y pertenecían a la misma granja.

La prevalencia de los siete genes asociados a virulencia testados se muestra en la *Figura 1*. De los 22 aislados de APEC, el 95%, 95%, 91%, 91% y 95% contenían los genes de virulencia *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* and *ompT*, respectivamente. Por el contrario, el 30%, 0%, 60%, 30% y 40% de las 10 cepas AFEC fueron positivas para dichos genes. Los genes *east1* y *colV* se detectaron en un 50% y un 36% en las cepas APEC y en un 10% y 30% en las AFEC, respectivamente. No se observó ninguna asociación significativa entre los ocho genes de virulencia y los serogrupos. La presencia de los genes de virulencia en las cepas AFEC fue menor en general (*Figura 1*).

Todas las cepas analizadas fueron multirresistentes (más de tres familias de antimicrobianos), incluyendo aquellos aislados de animales sanos, y un 50% fueron resistentes a más de ocho antimicrobianos. Los estudios de CMIs detectaron 11 cepas resistentes a cefalosporinas, seis de la familia *bla_{CTX-M}*, tres *bla_{SHV}* y dos *bla_{CMY-2}*. Un 91% de los aislados fueron resistentes a ciprofloxacina (wild type ≤ 0.064 mg/L) y un 88% a ácido nalidíxico (CMI ≥ 128 mg/L). Adicionalmente, el 91% de las cepas fueron resistentes a tetraciclina (Tet), el 78% a ampicilina (Amp), el 69% a estreptomycin (Str), el 63% a sulfametoxazol (Sul), el 59% a trimetoprim (Tm), el 34% a cefotaxime (Ctx), el 31% a ceftazidime (Caz), el 19% a kanamicina (Km), el 16% a gentamicina (Gm), el 13% a cloranfenicol (Chl) y el 6% a florfenicol (Ff) (*Figura 1*).

Los brotes de colibacilosis que afectaron a las distintas explotaciones durante el periodo de enero a marzo del 2012 fueron originados por cepas de *E. coli* no relacionadas genéticamente. Los marcadores de virulencia indican que dichas cepas contienen gran cantidad de genes de virulencia. A pesar de que algunas cepas AFEC también contenían genes de virulencia, estos se encontraban con menor frecuencia. Finalmente, este estudio demuestra una gran diversidad de poblaciones de *E. coli*

multirresistentes, tanto en cepas aisladas de aves sanas para consumo humano, como en las cepas causantes de colibacilosis. Por tanto, 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 clarificar la relevancia para la salud pública de la transmisión de resistencias entre cepas de origen animal y humano, y para preservar la acción de antibióticos de última generación en medicina humana.



*Phylogroup and cephalosporin resistance gene

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

References

- CLERMONT, O., BONACORSI, S. and BINGEN, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology* **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. *Veterinary Microbiology* **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. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science* **13**: 126-162.
- HASMAN, H., MEVIUS, D., VELDMAN, K., OLESEN, I. and AARESTRUP, F.M. (2005). β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **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. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (8): 2479-2482.
- JOHNSON, T.J., WANNEMUEHLER, Y., DOETKOTT, C., JOHNSON, S., ROSENBERG, S.C. and NOLAN, L.K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology* **46** (12): 3987-3996.
- MORENO, E., PRATS, G., SABATÉ, M., PÉREZ, T., JOHNSON J.R. and ANDREU, A. (2006). Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**: 204-211.
- RIBOT, E. M., FAIR, M.A., GAUTOM, R., CAMERON, D.N., HUNTER, S.B., SWAMINATHAN, B. and BARRETT, T.J. (2006). Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* **3** (1): 59-67.
- RODRIGUEZ-SIEK, K.E., GIDDINGS, C.W., DOETKOTT, C., JOHNSON, T.J. and NOLAN, L.K. (2004). Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research* **36**: 241-256.
- SMET, A., RASSCHAERT, G., MARTEL, A., PERSOONS, D., DEWULF, J., BUTAYE, P., CATRY, B., HAESBROUCK, F., HERMAN, L. and HEYNDRIKX, M. (2011). In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *Journal of Applied Microbiology* **110** (2): 541-549.
- YAMAMOTO, T. and ECHEVERRIA, P. (1996). Detection of the Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 Gene Sequences in Enterotoxigenic *E. coli* Strains Pathogenic for Humans. *Infection and Immunity* **64** (4): 1441-1445.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (8): 3483-3489.