

# Resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* de origen intestinal en gallinas

González-Lama, Z.; Martínez de Saavedra, M.T.; Lupiola Gómez, P.A.

Microbiología. Facultad de Veterinaria. ULPGC. Trasmontaña, s/n. 35416 Arucas (Gran Canaria).

## Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in hens.

**Palabras clave:** Resistencia a antibióticos, *Escherichia coli*, Gallinas.

**Keys words:** Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, Hens.

**RESUMEN:** Se han estudiado un total de 32 cepas de *Escherichia coli* aisladas del intestino de gallinas sanas. 17 cepas de *E. coli* procedían de gallinas tratadas con antibióticos como promotores de crecimiento, y 15 cepas de *E. coli* de gallinas sin tratar. Todas las cepas fueron sensibles a gentamicina y la mayoría de ellas fueron resistentes a tetraciclina. No encontramos diferencias significativas entre la resistencia que presentan a los antibióticos y la procedencia de las cepas de *E. coli*.

**SUMMARY:** We have studied 32 strains of *Escherichia coli* isolated from intestinal source of healthy hens. 17 strains of *E. coli* from healthy hens treated with antibiotic growth promoters, and 15 strains of *E. coli* from healthy hens without treatment with antibiotics. All strains of *E. coli* shown susceptibility to gentamicin and the most of these strains were tetracycline resistant. We do not found significant differences between antibiotic resistance and the source of the strains of *E. coli*.

## Introducción

*Escherichia coli* se caracteriza por ser cocobacilos Gram negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. El 95% de las cepas de *E. coli* fermentan la lactosa, de tal modo que cuando crecen en Agar MacConkey producen colonias de color rojo (19). La mayoría de las cepas de *E. coli*, de origen intestinal, forman parte de la microbiota normal del intestino de las gallinas; y se comportan como patógenos oportunistas cuando se encuentran en otro nicho ecológico. No obstante, hay algunas cepas de *E. coli* patógenas que son responsables del cuadro clínico denominado colibacilosis, que es un síndrome complejo, caracterizado por múltiples lesiones orgánicas, con aerosaculitis y pericarditis asociada, perihepatitis y peritonitis (17,18). Parece ser que las cepas productoras de este síndrome clínico poseen una serie de genes de virulencia y algunos otros factores que aún

no han sido detectados (16). Se ha observado que las carcasas de pollo después de la exvisceración se contaminan por *E. coli* y otras enterobacterias potencialmente patógenas, presentes en el intestino de estos animales y que con la práctica habitual, de lavado con agua, para eliminar la contaminación visible de las carcasas, no da los resultados apetecibles, de ahí que se recomiende lavar con agua fría con 25 ppm de cloro, ya que esta medida reduce, considerablemente, el nivel de contaminación en todas las muestras, por *E. coli* y otras enterobacterias potencialmente peligrosas (25). Los antibióticos se utilizan en la alimentación animal como promotores del crecimiento (24). Esta práctica es muy controvertida, ya que tiene un importante impacto en la resistencia bacteriana a los antibióticos y en la salud pública humana (2,7,9). El uso de los antibióticos, no sólo selecciona resistencias en bacterias patógenas, sino también en la microbio-

ta comensal de los individuos expuestos. Esto da lugar a resistencias cruzadas que van a disminuir la eficacia de los antibióticos en medicina humana. Distintos estudios han sido llevados a cabo para estudiar la resistencia que presentan las cepas de *E. coli*, aisladas de pollos y otros animales, a los antibióticos en distintas partes del mundo (3, 11, 14, 20, 21, 26, 27, 29), así como sus mecanismos de resistencia (4, 12, 13, 15, 22, 23, 28, 32, 33).

También se ha estudiado la relación que existe entre cepas de *E. coli*, aisladas de animales, alimentos y humanos (6, 8, 10, 31). De ahí la recomendación para el uso responsable y prudente de los agentes antimicrobianos en medicina veterinaria (1).

En este trabajo, nos proponemos estudiar la resistencia que presentan a los antibióticos distintas cepas de *E. coli* aisladas del contenido intestinal de gallinas sanas a las que se les había suministrado antibióticos como promotores del crecimiento, y otro grupo de cepas de *E. coli* aisladas del contenido intestinal de gallinas sanas a las que no se les había administrado ningún antibiótico.

## Material y métodos

Se han aislado 15 cepas de *E. coli* a partir de hisopos rectales, con solución salina estéril, de gallinas a las que no se les había administrado ningún antibiótico, y 17 cepas de *E. coli* procedentes del contenido intestinal de gallinas a las que se les había suministrado los siguientes antibióticos: Gentamicina 5 mg, Sulfadimetoxina sódica 18 mg y Trimetoprim 3 mg. Las muestras se sembraron en Agar MacConkey y fue-



**Tabla 1.** Resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* de origen fecal aisladas de gallinas.

Gallinas	Nº cepas	GM10	AM10	SxT 25	TE30	E15
Grupo Control	15	0% R	7% I	27% R	86% R	7% R 93% I
Grupo Tratado	17	0% R	0% R	6% R	100% R	12% R 88% I

R: resistente, I: intermedio, GM10 (gentamicina) AM10 (ampicilina), SxT25 (sulfametoxazol-trimetoprim), TE30 (tetraciclina), E15 (eritromicina).

ron incubadas a 37°C durante 24 horas. A las colonias sospechosas de ser *E. coli* se les realizó un API20E con el fin de identificarlas. El API20E es un sistema para la identificación bioquímica de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos, mediante 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas y una base de datos. El API20E nos fue suministrado por la casa comercial Biomérieux (Francia). Una vez identificadas las cepas de *E. coli*, se procedió a realizarles el antibiograma, empleando la técnica disco-placa de Kirby y Bauer (5). Los antibióticos utilizados fueron discos de papel impregnados de: Gentamicina 10 mg (GM10), Eritromicina 15 mg (E15), Ampicilina 10 mg (AM10), Trimetoprim x Sulfametoxazol 25 mg (SXT 25) y Tetraciclina 30 mg (TE 30). Las placas de Agar Mueller-Hinton se siembran en barniz continuo con la cepa de *E. coli* a la que se le va a realizar el antibiograma, y a continuación se colocan los discos impregnados de antibióticos, separados unos de otros a una distancia en que los halos de inhibición no se toquen. Se incuban durante 24 horas a 37°C y se procede a la medición de los diámetros de los halos de inhibición, expresados en milímetros. La interpretación de los mismos se hace de acuerdo con las normas dictadas por la NCCLS (30), las bacterias se denominan con respecto a cada antibiótico: S: sensibles, I: intermedias o R: resistentes, dependiendo del diámetro de los halos de inhibición y las normas de la NCCLS. Todos los medios de cultivo utilizados y los discos de antibiótico nos fueron suministrados por la casa comercial Difco (USA).

## Resultados y discusión

Hemos aislado 17 cepas de *E. coli* a partir de contenido intestinal de gallinas sanas tratadas con antibióticos (gallinas tratadas) y 15 cepas de *E. coli* a partir de contenido intestinal de gallinas sanas sin tratamiento previo de antibióticos (gallinas control). A todas las cepas aisladas les hemos realizado un antibiograma con cinco antibióticos representantes de diferentes grupos de antibacterianos: Gentamicina (aminoglicósidos), Ampicilina (beta-lactámicos), Eritromicina (macrólidos), Sulfametoxazol-Trimetoprim (antagonistas de la síntesis del ácido fólico), Tetraciclina (tetraciclina).

Como se observa en la tabla I, todas las cepas fueron sensibles a la gentamicina, tan sólo una cepa (perteneciente al grupo control) presentó una resistencia intermedia a la ampicilina, el resto de las cepas fueron sensibles a la ampicilina. Con respecto a la eritromicina, tan sólo una cepa perteneciente al grupo control y dos cepas pertenecientes al grupo tratado fueron resistentes; el resto de las cepas presentaban una resistencia intermedia. La mayor resistencia la presentaron frente a tetraciclina, un 86% del grupo control y un 100% del grupo tratado. Es de destacar la resistencia que presentan frente al SxT, las cepas procedentes del grupo control el 27% eran resistentes frente al 6% de las cepas procedentes del grupo tratado. Todas las cepas resistentes a SxT también lo fueron a la tetraciclina. En USA (4) en cepas de *E. coli* de origen aviar encuentran que un 86% era resistente a tetraciclina y en Sudáfrica (22) encuentran que *E.*

*coli* aisladas de carcasas de pollo presentan un 96% de resistencia a tetracilinas, estos resultados son similares a los encontrados en nuestras cepas con respecto a la tetraciclina. En cambio, en otros estudios llevados a cabo en Suiza (28) sobre gallinas ponedoras que habían muerto de septicemia aislaron cepas de *E. coli* que presentaban las siguientes resistencias: 11% a ampicilina, 2% a gentamicina, 11% a SxT y 26% a tetracilinas. En Irlanda (14) a partir de gallinas enfermas o muertas aislaron *E. coli* con las siguientes resistencias: 23% a ampicilina, 2,6% a gentamicina, 18,5 % a SxT y 55% a tetracilinas. Estas resistencias encontradas en Suiza e Irlanda son más similares entre sí, que las encontradas por nosotros. En pollos sanos en la Rioja (31) aislaron cepas de *E. coli* de origen fecal con las siguientes resistencias: 58% a ampicilina, 40% a gentamicina, 65% a SxT y 75% a tetracilinas.

Como podemos observar en los estudios consultados, en general todas las cepas estudiadas presentan resistencias a ampicilina y gentamicina más altas que las encontradas por nosotros, y al SxT varían desde un 11% hasta un 65 %, encontrándose nuestras cepas en unos valores intermedios. Con respecto a la resistencia a tetracilinas, nuestras cepas son las que presentan una resistencia más elevada. En líneas generales, cuando comparamos las resistencias que presentan nuestras cepas del grupo control y el grupo tratado, podemos observar que en general los resultados son muy similares; no presentan ninguna resistencia a la gentamicina (antibiótico que le había sido administrado al grupo tratado) y con respecto al SxT, que también le había sido administrado al grupo tratado, encontramos mayores resistencias (27%) en el grupo control que en el grupo tratado(6%). Podemos concluir, por tanto, que en nuestro estudio hemos observado que la administración de esos antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, no parecen haber influido en la aparición de resistencias en *E. coli* de origen fecal.



## Bibliografía

1. Anthony, F., Acar, J., Franklin, A., Gupta, R., Nicholls, T., Tamura, Y., Thompson, S., Therelfall, E.J., Vose, D., van Vuuren, M., White, D.G.: Office International des Epizooties Ad hoc Group. (2001). Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *Rev. Sci. Tech.* 20(3): 829-39.
2. al-Sam, S., Linton, A.H., Bennett, P.M., Hinton, M. (1993). Effects of low concentration of ampicillin in feed on the intestinal *Escherichia coli* of chicks. *J. Appl. Bacteriol.* 75(2): 108-12.
3. Barton, M.D., Pratt, R., Hart, W.S. (2003). Antibiotic resistance in animals. *Commun. Dis. Intell.* 27 Suppl: S121-6.
4. Bass, L., Liebert, C.A., Lee, M.D., Summers, A.O., White, D.O., Theyer, S.G., Maurer, J.J. (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(12): 2925-29.
5. Bauer, A.W., Kirby, M.M.W., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-6.
6. van den Bogaard, A.E. (1997). Antimicrobial resistance-relation to human and animal exposure to antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 453-454.
7. van den Bogaard, A.E. (2001). Human health aspects of antibiotic use in food animals: a review. *Tijdschr.Diergeneeskd.* 126(18): 590-5.
8. van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E.E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 763-771.
9. van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. (1999). Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs*, 58(4): 589-607.
10. van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int.J.Antimicrob. Agents.* 14: 327-335.
11. Bren, L. (2001). Antibiotic resistance from down on the chicken farm. *FDA Consum.* 35(1): 10-11.
12. Briñas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., García, M., Domínguez, L., Torres, C. (2003). Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(6): 2056-58.
13. Chaslus-Dancla, E., Gerbaud, G., Lagorce, M., Lapont, J.P., Courvalin, P. (1987). Persistence of an antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of selective pressure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31(5): 784-788.
14. Cormican, M., Buckley, V., Corbett-Feeney, G., Sheridan, F. (2001). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from turkeys and hens in Ireland. *J.Antimicrob. Chemother.* 48: 587-588.
15. David, B.P., Purushothaman, V., Venkatesan, R.A. (1991). Comparison of plasmid profile analysis, antibiogram testing, resistotyping and biotyping in the identification of *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Rec.* 129(5): 94-97.
16. Delicato, E.R., Guimaraes de Brito, B., Gaziri, L.C.J., Vidotto, M.C. (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet.Microbiol.* 94: 97-103.
17. Dias da Silveira, W., Ferreira, A., Brocchi, M., Hollanda, L.M., Pestana de Castro, A.F., Yamada, A.T., Lancellotti, M. (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet.Microbiol.* 85: 47-53.
18. Ewers, C., Janssen, T., Wieler, L.H. (2003). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 116(9-10): 381-95.
19. Ewing, W.H. (1986). *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co. New York, NY, USA.
20. Franklin, A. (1999). Current status of antibiotic resistance in animal production. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 92: 23-8.
21. Frei, A., Goldenberger, D., Teuber, M. (2001). Antimicrobial susceptibility of intestinal bacteria from Swiss poultry flocks before the ban of antimicrobial growth promoters. *Syst. Appl. Microbiol.* 24(1): 116-21.
22. Geornaras, I., Hastings, J.W., von Holy, A. (2001). Genotypic analysis of *Escherichia coli* from strains poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents. *Appl.Environ.Microbiol.* 67(4): 1940-4.
23. Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(3): 489-92.
24. Kamphues, J. (1999). Antibiotic growth promoters for the view of animal nutrition. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 112(10-11): 370-9.
25. Jiménez, S.M., Tiburzi, M.C., Salsi, M.S., Pirovani, M.E., Moguelevsky, M.A. (2003). The role of visible faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform, and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering. *J. Appl. Microbiol.* 95(3): 451-6.
26. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Morioka, A., Kojima, A., Ohzono, T., Ogikubo, K., Takahashi,



- T., Tamura, Y. (2003). A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. *Antimicrob. Chemother.* 51(2): 447-51.
27. Lambie, N., Ngeleka, M., Brown, G., Ryan, J. (2000). Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers subjected to postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. *Avian Dis.* 44(1): 155-60.
28. Lanz, R., Kuhnert, P., Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91: 73-84.
29. Moreno, M.A., Domínguez, L., Teshager, T., Herrero, I.A., Porro, M.C., The VAV Network. (2000). Antibiotic resistance monitoring: The Spanish programme. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14: 285-90.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (1977). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2-A6. NCCLS. Wayne, Pa. USA.
31. Saenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 18: 353-58.
32. Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001). Use antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32(3-4): 201-25.
33. Sengelov, G., Halling-Sorensen, B., Aarestrup, F.M. (2003). Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals. *Vet. Microbiol.* 95: 91-101.