

RESISTENCIA A FLUOROQUINOLONAS, CO-RESISTENCIAS Y SECUENCIOTIPOS CIRCULANTES DE *Escherichia coli* EN LA DIARREA NEONATAL DE TERNEROS EN URUGUAY

Ana Umpiérrez^{a,*}, Inés Bado^b, Martín Olivera^a, Sofía Acquistapace^a, Rafael Vignoli^b, Pablo Zunino^a

^aDepartamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, CP: 11600. Montevideo, Uruguay. * aumpierrez@iibce.edu.uy

^bDepartamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Av. Alfredo Navarro 3051, CP: 11600. Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

Escherichia coli está presente en casos de Diarrea Neonatal en Terneros en Uruguay. Estudios previos han demostrado la alta prevalencia de genes de virulencia en cepas obtenidas en animales enfermos y también en animales sanos.

El uso indiscriminado de antibióticos en la clínica humana como en la veterinaria ha ido acompañado de un aumento en las resistencias a los mismos por décadas, acarreando importantes complicaciones en los tratamientos. Por ello, en los últimos años se promueve intensamente su uso responsable, de forma de evitar la emergencia de esta situación.

En este trabajo se evaluaron los perfiles de resistencia y secuenciotipos circulantes de cepas de *E. coli* presentes en terneros. Se observaron resistencias elevadas a varios antibióticos, como Enrofloxacin, y la ocurrencia de cepas resistentes a oximiinocefalosporinas. Además se constató la ocurrencia de secuenciotipos previamente descritos en humanos, lo que demostraría la potencialidad de las mismas de causar enfermedad en humanos.

SUMMARY

Escherichia coli is present in cases of Neonatal Calf Diarrhoea in Uruguay. Previous studies have demonstrated the high prevalence of virulence genes in strains isolated from ill and healthy animals.

The indiscriminate use of antibiotics in human and veterinary clinic has been accompanied by an increase in resistance for decades,

bringing major complications in treatment. Therefore, a responsible use of them is strongly recommended to avoid the emergence of this situation.

In this paper, the resistance profiles and circulating sequence type of *E. coli* in calves were evaluated. High resistance to antibiotics, such as enrofloxacin, and the occurrence of oxyiminocephalosporin resistant strains were observed. In addition, the occurrence of human sequence types demonstrates the potential of them to cause disease in humans.

INTRODUCCIÓN

La diarrea neonatal de terneros (DNT) es una enfermedad infectocontagiosa de alto impacto en el mundo (Lorenz *et al.*, 2011) y en Uruguay. Es responsable de importantes pérdidas económicas debidas a las altísimas tasas de morbi-mortalidad y los gastos en tratamientos y mano de obra (Margueritte, 2007; Ok *et al.*, 2009). Estudios en nuestro laboratorio han identificado a *E. coli* como uno de los patógenos presentes en casos de DNT (Acuña *et al.*, 2013, Umpiérrez *et al.*, 2014). Su caracterización molecular, asimismo reveló que existen factores de virulencia con altas prevalencias, resultados que concuerdan con lo reportado en la región (Andrade *et al.*, 2012; Kolenda *et al.*, 2015; Umpiérrez *et al.*, 2015a,b). La detección de variantes génicas circulando en animales sanos y enfermos, evidencia el potencial patógeno de estos microorganismos y resalta la esencialidad de implementar estrategias de prevención (Umpiérrez *et al.*, 2015a).

La antibioticoterapia si bien puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades como la DNT, también promueve la selección de cepas multirresistentes. El conocimiento del perfil de resistencia a antimicrobianos de las

cepas circulantes es imprescindible para alcanzar el éxito terapéutico y disminuir la diseminación de clones resistentes (Constable,

2004; Mateu and Martin, 2004).

Determinar los perfiles de resistencia a antimicrobianos y los secuenciotipos circulantes de una colección de cepas de *E. coli* a partir de heces de animales afectados con DNT y de animales sanos en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una colección de 303 aislamientos de *E. coli* provenientes de heces de terneros que presentaban síntomas de DNT y animales sanos a lo largo de Uruguay, previamente generada en el Departamento de Microbiología del IIBCE. Estos aislamientos fueron sembrados en agar Müller Hinton suplementado con Cirpofloxacina (0,125 µg/ml) durante 24 horas a 37°C, utilizando como control la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922. A aquellos aislamientos capaces de crecer en este medio se les realizaron estudios ampliados de susceptibilidad por el método de disco-difusión de Kirby-Bauer en agar Müller-Hinton, siguiendo las normas de la CLSI 2016 (Clinical Laboratory Standard Institute). Los antibióticos utilizados fueron amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP), cefuroxime (CXM), ceftriaxona (CRO), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IMP), meropenem (MEM), ácido nalidixico (NA), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacina (ENR), gentamicina (CN), amikacina (AK), trimetoprim-sulfamethoxazol (SXT), fosfomicina (FOS) y azitromicina (AZM). El control de calidad fue realizado con la cepa de *E. coli* ATCC 25922. Además, se realizó test de sinergia para la búsqueda de -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en las cepas que presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Asimismo, como criterio de selección se incluyó la presencia de genes de virulencia y la ocurrencia de pertenecer a distintas variantes génicas. Paralelamente se evaluó la estructura poblacional de la colección de *E. coli* mediante la técnica *Multilocus Sequence Typing* (MLST). La determinación de los secuenciotipos se realizó de acuerdo a lo establecido en The Warwick Medical School, *E. coli* MLST Database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>).

RESULTADOS

133 aislamientos crecieron en el medio de tamizaje; de éstos, 21 fueron descartados por presentar el mismo perfil de virulencia y pertenecer a la misma variante génica. Dentro de los 112 restantes, 83 fueron resistentes a CIP. Dentro de estos 59/83 (71%) fueron multirresistentes (resistencia a tres o más clases de antibióticos). Las co-resistencias fueron: 82/83 (98,8%) a ENR, 66 (79,5%) a AMP, 57 (68,7%) a SXT, 20 (24%) a AZM, 16 (19%) a CN y 9 (10,8%) a oxiiminocefalosporinas (6 a CXM y 3 a CRO y/o CAZ), 3 (0,3%) a FOS y uno a AK. No se observaron cepas resistentes a FEP, IMP o MEM. Dos aislamientos fueron productores de BLEE.

Se identificaron 17 ST diferentes circulando, incluyendo 4 clasificados como nuevos. Todos los ST identificados fueron descritos tanto en muestras bovinas como en muestras de otros orígenes. Se detectó además un ST (ST101) presente en un animal enfermo y en uno sano en un mismo establecimiento ganadero.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Una elevada cantidad de cepas fue resistente a FQ incluyendo a ENR, antibiótico ampliamente utilizado en la clínica veterinaria. La mayoría además, fueron multirresistentes. Esta observación puede deberse a una presión de selección ejercida por el frecuente uso de ENR, sumado a la posible asociación de los mecanismos de resistencia a elementos genéticos móviles que promueven su diseminación. Por esta razón, es necesaria la búsqueda a nivel molecular de estos mecanismos de resistencia para conocer su epidemiología a nivel veterinario.

Los análisis de la estructura poblacional identificaron 17 ST de *E. coli* diferentes circulando en Uruguay. Se destaca la presencia de los complejos ST69 y ST29, distribuidos mundialmente en bovinos y también en humanos, y la ocurrencia del ST101 en animales sanos y enfermos.

Los resultados confirman que la resistencia a antibióticos es un problema cada vez más relevante en la gandería en Uruguay y de-

bería ser tenida en cuenta cuando se establezcan estrategias de manejo y prevención de la DNT como de otras enfermedades infectocontagiosas. Además, se evidenció que existen ST circulantes con potencialidad de causar enfermedad en humanos. Desde un punto de vista epidemiológico, este escenario de resistencias podría jugar un rol importante en enfermedades zoonóticas causadas por estos microorganismos, favoreciendo la transmisión a humanos de cepas multirresistentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña P, Umpiérrez A, Bengoechea V, Berois M, Reolón E, Zunino P (2013) Identificación de *Escherichia coli*, Rotavirus y Coronavirus bovino asociados a la diarrea neonatal de los terneros en Uruguay. XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría. 13 y 14 de Junio, Paysandú, Uruguay.
- Andrade GI, Coura FM, Santos EL, Ferreira MG, Galinari GC, Facury Filho EJ, de Carvalho AU, Lage AP, Heinemann MB (2012) Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. Trop Anim Health Pro 44:1783-1790.
- Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S16E. Constable PD (2004) Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. J Vet Inter Med 18:8-17.
- Lorenz I, Fagan J, More SJ (2011) Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. I Vet JI 64:1-9.
- Margueritte JM, N, Blackhall J, Fernández F, Parreño V, Vangonzzi A, Odeón A, Combes G (2007) Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y tratamiento. El sitio Argentino de producción animal.
- Mateu E, Martin M (2001) Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 48:569-581.
- Ok M, Guler L, Turgut K, Ok U, Sen I, Gunduz IK, Birdane MF, Guzelbektes H (2009) The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. Zoonoses Public Health 56, 94-101.
- Umpiérrez A, Acquistapace S, Fernández S, Acuña P, Reolón E, Zunino P (2014) Characterization of *Escherichia coli* associated to NCD cases in Uruguay. XVIII World Buiatrics Congress. 27 de julio - 1 de Agosto, Cairns, Australia.
- Umpiérrez A, Acquistapace S, Oliver M, Fernández S, Acuña P, Reolón E, Zunino P (2015a) Caracterización de *Escherichia coli* asociada a la diarrea neonatal de terneros en Uruguay. XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. 12 y 13 de Junio, Paysandú, Uruguay.
- Umpiérrez A, Acquistapace S, Fernández S, Oliver M, Acuña P, Reolón E, Zunino P (2015b) Prevalence of *Escherichia coli* adherence-related genes in Neonatal Calf Diarrhoea in Uruguay. J Infect Dev Ctries. Aceptado, en prensa.

DETECCIÓN DE AGENTES CAUSALES DE DIARREA NEONATAL BOVINA EN 2 TAMBOS DE COLONIA, URUGUAY

Caffarena, RD.^{1,*}, Fraga, M.¹, Castells, M.², Colina, R.², Schild, CO.¹, Riet-Correa, F.¹, Giannitti, F.^{1,3}

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Ruta 50 km 11, Colonia (70000), Uruguay.

*Correspondencia: dccaffarena@inia.org.uy

²Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República, Salto, Uruguay.

³University of Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory, Saint Paul, Minnesota, USA.

RESUMEN

El síndrome de diarrea neonatal (SDN) es una de las principales enfermedades en terneros de <30 días de vida. En este trabajo re-

portamos las causas detectadas en 2 brotes de SDN en terneros Holstein de 3-15 días de vida en 2 tambos de Colonia, Uruguay. Veinte muestras de materia fecal, 13 diarreicas y 7 no diarreicas, fueron procesadas para detección de Rotavirus, Coronavirus bovino, *Cryptosporo-*