

Bacteriófagos como alternativa terapéutica frente a *Enterococcus* spp. en avicultura

J. GARCIA-LLORENS^{1,2*}, J. TORRES-BONCOMPTE^{1,2}, P. CATALÁ-GREGORI¹, J.M. SORIANO DEL CASTILLO² and S. SEVILLA-NAVARRO¹

¹CECAV (Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunitat Valenciana), 12539, Carrer Nules 16, Les Alqueries (Castelló); ² Food & Health Lab, Institute of Materials Science, Universitat de València, 46980 València.

*e-mail: j.garcia@cecav.es

ABSTRACT

Antimicrobial resistances are one of the major threats to public health and ESKAPE organisms, such as *Enterococcus*, have been identified as a major cause of infections worldwide. From an animal health perspective, *Enterococcus* (*E. cecorum* and *E. faecalis*) emerges as a clinically relevant pathogen in the poultry sector becoming a significant cause of morbidity and mortality in breeders and broilers worldwide. It is a bacterium with limited therapeutic options, since there are currently no effective vaccines available and antibiotic therapy is ineffective once the flock has been infected and shows the first clinical signs. For this reason, the development of new control tools, such as bacteriophages, is becoming increasingly necessary. Bacteriophages, viruses of bacteria, are postulated as an alternative, safe and effective measure against multi-resistant bacteria. In this context, the aim of this study was to isolate and characterize specific bacteriophages against clinical strains of *Enterococcus* to evaluate their potential as an alternative to antibiotics. For this purpose, a phage isolation protocol was implemented from environmental samples from poultry farms. The isolated bacteriophages were selected according to their lysis spectrum against 26 antibiotic-resistant *Enterococcus* strains, and those of greatest clinical interest were characterized by electron microscopy, pH stability, temperature and UV light. A total of 8 effective bacteriophages were isolated. Of the total number of phages, 4 had lytic capacity against 82% of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. bacteria. The stability of the phages in in vitro assays showed that they were able to survive in pH ranges from 4 to 11, at temperatures of 70°C and UV exposures of up to 2 hours. Despite the specificity of bacteriophages, they have been shown to have a broad spectrum of action, being able to lyse most bacterial isolates (n=26). The viability

rate of the isolated phages shows a great potential for infection control and prevention, opening the door to bacteriophages as a therapeutic tool against multidrug-resistant *Enterococcus*.

Keywords: *Enterococcus*; bacteriophages; safety; antimicrobial; resistance

RESUMEN

Las resistencias antimicrobianas son una de las mayores amenazas para la salud pública y los organismos ESKAPE, como *Enterococcus*, han sido identificados como una de las principales causas de infecciones a nivel mundial. Desde el punto de vista de la salud animal, *Enterococcus* (*E. cecorum* y *E. faecalis*) emerge como un patógeno clínico relevante en el sector avícola convirtiéndose en una causa significativa de morbilidad y mortalidad en reproductoras y pollos de engorde de todo el mundo. Se trata de una bacteria con limitadas opciones terapéuticas, ya que no se dispone actualmente de vacunas eficaces y la terapia con antibióticos es inefectiva una vez el lote ha sido infectado y muestra los primeros signos clínicos. Es por ello, que cada vez es más necesario el desarrollo de nuevas herramientas de control, como los bacteriófagos. Los bacteriófagos, virus de bacterias, se postulan como una medida alternativa, segura y eficaz frente a bacterias multirresistentes. En este contexto, el objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacteriófagos específicos frente a cepas clínicas de *Enterococcus* para evaluar su potencial como alternativa a los antibióticos. Para ello, se implementó un protocolo de aislamiento de fagos a partir de muestras ambientales procedentes de granjas avícolas. Los bacteriófagos aislados se seleccionaron en función de su espectro de lisis frente a 26 cepas de *Enterococcus* resistentes a antibióticos, y, los de mayor interés clínico se caracterizaron mediante microscopía electrónica, estabilidad de pH, temperatura y luz UV. Se aislaron un total de 8 bacteriófagos efectivos. Del total de fagos, 4 presentaban capacidad lítica frente al 82% de bacterias de *Enterococcus* spp. multirresistentes. La estabilidad de los fagos en los ensayos *in vitro*, demostraron ser fagos capaces de sobrevivir en rangos de pH de 4 a 11, a temperaturas de 70°C y a exposiciones a UV de hasta 2 horas. A pesar de la especificidad de los bacteriófagos, estos han demostrado presentar un amplio espectro de acción, siendo capaces de lisar la mayoría de los aislados bacterianos (n=26). La tasa de viabilidad de los fagos aislados muestra un gran potencial para el control y prevención de infecciones, abriendo la puerta a los bacteriófagos como herramienta terapéutica frente a cepas de *Enterococcus* multirresistentes.

Palabras clave: *Enterococcus*; bacteriófagos; seguridad; antimicrobianos; resistencias

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es una de las mayores amenazas para la salud pública, destacando los organismos ESKAPE, entre ellos *Enterococcus*, como principales agentes de infecciones nosocomiales. En avicultura, *E. cecorum* y *E. faecalis* se han convertido en una causa significativa de morbilidad y mortalidad en reproductoras y pollos de engorde (Jung et al., 2018).

La presencia de *Enterococcus* resistentes, suscita una gran preocupación debido a las opciones de tratamiento limitadas, la transferencia de resistencia y el aumento de las tasas de infección. Por ello, la búsqueda de alternativas a los antibióticos es de vital importancia. Así pues, los bacteriófagos, virus que solo infectan bacterias, se postulan como una opción prometedora, por ello el "biocontrol con fagos", se erige como un enfoque natural, efectivo y económicamente viable para garantizar la seguridad alimentaria. (Moye et al., 2018)

Este estudio tiene como objetivo el aislamiento y caracterización de bacteriófagos eficaces para abordar cepas de *Enterococcus* multirresistentes aisladas en avicultura, ofreciendo así una alternativa sostenible y eficaz a los antibióticos convencionales, y contribuyendo a mitigar la problemática de las resistencias antimicrobianas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas de campo de *Enterococcus* spp. fueron seleccionadas del repositorio de microorganismos del CECAV (Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunitat Valenciana). Para la determinación de resistencia a antibióticos se emplearon las placas Sensititre™ EU Surveillance *Enterococcus* EUVENC AST Plate (Thermofisher), las cuales permiten determinar resistencias a antimicrobianos. Los aislados se clasificaron como sensibles o resistentes de acuerdo con los cortes epidemiológicos descritos por el Comité europeo del antibiograma (EUCAST; por sus siglas en inglés) (EUCAST, 2023) y por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023). Una cepa se definió como MDR si resultó ser resistente a tres o más familias de antibióticos antimicrobianos. (EFSA and ECDC, 2023).

Tras analizar las cepas bacterianas, se procedió a el aislamiento de bacteriófagos efectivos contra las cepas objeto multirresistentes. Por ello se hizo uso de muestras primarias de avicultura incluyendo muestras de heces y muestras de ambiente provenientes de granjas avícolas, seguidamente las muestras se enriquecieron con las cepas bacterianas de interés y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24h. La formación de zonas claras en placas de agar indicó lisis bacteriana causada por fagos. Tras el aislamiento, la purificación y posterior multiplicación de los fagos obtenidos, se procedió a la caracterización fenotípica por resistencia a condiciones ambientales adversas, como Temperatura (Ahmadi *et al.*, 2016), pH (Ahmadi *et al.* (2016) y Huang *et al.* (2018)) y luz UV

(Kimet al., 2018). Además, se procedió a realizar un rango de hospedadores, probando los aislados a diferentes géneros y especies bacterianas para probar la alta especificidad de los bacteriófagos.

RESULTADOS

Tras analizar el perfil de resistencias de las cepas de *Enterococcus* se determinó que la sensibilidad fue del 100% para el cloranfenicol (CHL) y la teicoplanina (TEI). Por otro lado, se observó una resistencia del 100% a la quinupristina/dalfopristina (SYN). Se detectó resistencia a la vancomicina (VAN) en el 9% de las cepas, lo que representó 2 de las 23 cepas analizadas. Además, un 82% de las cepas demostraron ser bacterias multirresistentes (MDR). Tras realizar la prueba de rango de hospedadores con diferentes bacterias de diferentes filos y géneros bacterianos, mostraron especificidad única frente a *Enterococcus*.

En cuanto a la obtención de bacteriófagos, se logró aislar un total de 10 fagos. De los cuales se seleccionaron 4 para su caracterización. La caracterización de los bacteriófagos reveló cualidades excepcionales en términos de adaptabilidad y resistencia a diversas condiciones ambientales, lo que mostró su potencial para sobrevivir en condiciones adversas.

En cuanto al pH, estos bacteriófagos destacan por su capacidad para funcionar eficazmente en un amplio rango, desde niveles ácidos de pH 4 hasta alcalinos de pH 11.

En cuanto a la resistencia a temperatura los fagos pueden sobrevivir en condiciones de -80°C hasta 60°C. En el caso excepcional del aislado FECC04, demostró supervivencia durante 30 minutos a 70°C.

Por lo que respecta a la exposición a la luz ultravioleta (UV), los bacteriófagos muestran una sorprendente capacidad de resistencia. Pudieron sobrevivir hasta dos horas bajo exposición a la luz UV, manteniendo alrededor del 50% de su viabilidad.

La caracterización por microscopía electrónica reveló que los bacteriófagos morfológicamente corresponden al género *Saphexavirus* en el caso de FGECC01, por otro lado, FGECC02, 03 y 04 corresponden al género *Shiekvirus* (Figura 1).

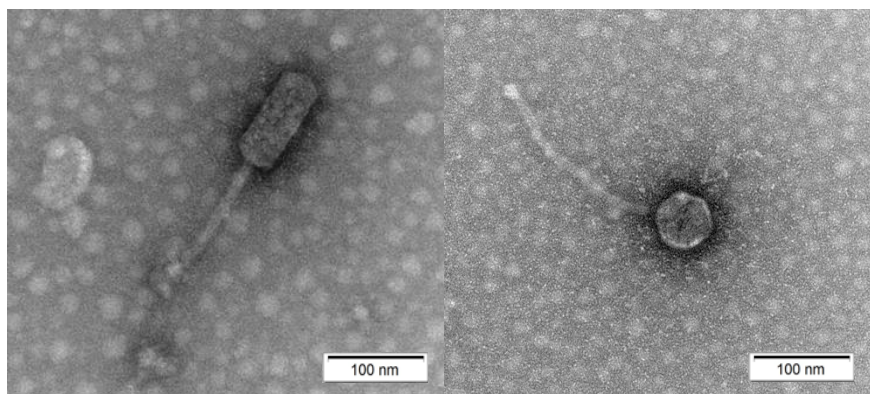


Figura 1. A la izquierda FGECC01, a la derecha FGECC02.

DISCUSIÓN

En conjunto, los resultados resaltan la robustez de los bacteriófagos y su capacidad para enfrentar un amplio espectro de desafíos ambientales. La amplia tolerancia a diferentes pH, la supervivencia a altas temperaturas, y la resistencia a la exposición a la luz UV hacen de los bacteriófagos aislados candidatos prometedores en campos como la industria alimentaria y la salud ambiental, donde su adaptabilidad y resistencia pueden ser imprescindibles para futuras aplicaciones.

Estos hallazgos brindan evidencia para considerar los bacteriófagos como candidatos prometedores en campos como la industria alimentaria y la medicina veterinaria. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones adicionales para comprender cómo estas características se traducen en aplicaciones prácticas y cuál es su eficacia real en entornos más específicos.

REFERENCIAS

- Ahmadi, M., Amir Karimi Torshizi, M., Rahimi, S., and Dennehy, J. J. (2016). Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-infection Administration in Reducing Salmonella enterica serovar Enteritidis Shedding in Quail. *Frontiers in Microbiology*,7, 1253.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition ed. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2023. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal* 2023; 21(3):7867, 232 pp.
- EUCAST. "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1 (2023)
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology, and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 6), 1749–1757.
- Huang, C., Virk, S. M., Shi, J., Zhou, Y., Willias, S. P., Morsy, M. K., Abdelnabby, H. E., Liu, J., Wang, X., and Li, J. (2018). Isolation, characterization, and application of Bacteriophage LPSE1 against Salmonella enterica in Ready to Eat (RTE) Foods. *Frontiers in Microbiology*,9, 1046.
- Jung, A., Chen, L. R., Suyemoto, M. M., Barnes, H. J., & Borst, L. B. (2018). A Review of *Enterococcus cecorum* Infection in Poultry. *Avian diseases*, 62(3), 261–271.
- Kim, S., Kim, S. H., Rahman, M., and Kim, J. (2018). Characterization of a Salmonella Enteritidis bacteriophage showing broad lytic activity against Gram-negative enteric bacteria. *Journal of Microbiology*, 56(12), 917–925.

Moye, Z.D.; Woolston, J.; Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses* 2018, *10*, 205. <https://doi.org/10.3390/v10040205>