

Estudio de resistencias antimicrobianas en cepas de *Salmonella* spp. aisladas en ponedoras, pollos y pavos durante 2017.

V. CORTÉS^{1*}, S. SEVILLA-NAVARRO¹, C. GARCÍA¹, E. BRAVO¹, M. ORENGA¹, C. MARÍN² y P. CATALÁ-GREGORI^{1,2}.

¹Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV), Castellón, Spain, ²Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia, Spain.

*Corresponding autor: v.cortes@cecav.es

Salmonella spp. es uno de los patógenos zoonóticos de mayor importancia en salud pública a nivel mundial. Los últimos datos publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) muestran un total de 94.530 casos de salmonelosis en Europa en 2016. Durante muchos años, los productos antimicrobianos se han utilizado ampliamente en sanidad humana y animal, en este último caso, también como promotores del crecimiento. Este uso generalizado, ha promovido el desarrollo de resistencias a antibióticos como se ha demostrado en múltiples investigaciones en todo el mundo.

Debido a la creciente preocupación por el desarrollo de resistencias en *Salmonella* spp., el objetivo de este estudio fue analizar el patrón de resistencias en 117 cepas aisladas en los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* (PNCS) en granjas de pollos, pavos y ponedoras durante el año 2017 en la Comunidad Valenciana. Se evaluó la resistencia a 14 antibióticos mediante la técnica de susceptibilidad antimicrobiana basada en la técnica de microdilución en caldo. La resistencia microbiológica se evaluó utilizando valores de corte epidemiológico (ECOFF).

Un 83% de las cepas aisladas en pavos presentaron multirresistencias (resistente a 3 o más antibióticos), frente a un 38% en pollos. En ponedoras no se aislaron cepas multirresistentes. En pavos se observaron las siguientes tasas de resistencias: Sulfometoxazol (83%), Ciprofloxacina (83%), Tetraciclinas (74%), Ácido Nalidíxico (70%), Ampicilina (61%), Gentamicina (22%), Trimetoprim (13%) y Cefotaxima (13%). En pollos se detectaron resistencias frente a Sulfometoxazol (87%), Gentamicina (47%), Ciprofloxacina (40%), Ácido Nalidíxico (26%), Tetraciclinas (24%), Trimetoprim (19%) y Ampicilina (15%). Y en ponedoras se observaron resistencias frente a Sulfometoxazol (50%), Tetraciclinas (13%), Colistina y Ampicilina (6%). Estos resultados sugieren que existen diferencias de resistencia antibiótica en *Salmonella* spp. dependiendo de la orientación productiva avícola. Por otra parte, la producción avícola puede ser una fuente potencial de transmisión de cepas de *Salmonella* spp. resistentes, por ello el establecimiento de sistemas de monitoreo previa aplicación de antibióticos y las buenas prácticas sanitarias, son necesarios para disminuir las tasas de resistencias y la propagación de cepas resistentes.

Palabras Clave: *Salmonella*; Resistencias antimicrobianas; Antibióticos; Avicultura; Microdilución en caldo.

Salmonella spp. is one of the most important zoonotic pathogens with economic impact in public health worldwide. The latest results reported by the European Food Safety Authority indicated that *Salmonella* was responsible for 94.530 human cases of salmonellosis in Europe. For many years, antimicrobial agents have been widely used in human and veterinary medicine, not only for prevention and treatment of diseases, but also as growth-promoting substances. This widespread use has promoted the development of antimicrobial resistant bacteria, as it has been reported in many investigations around the world.

Due the growing concern in the antimicrobial resistances development of *Salmonella* strains, the aim of this study was to analyze the resistances pattern in 117 strains isolated from turkeys, layers and broilers farms according to the National *Salmonella* Control Programs in 2017 at Comunidad Valenciana. The resistance to 14 antibiotics was assessed by the antimicrobial susceptibility test, based on broth microdilution method. Epidemiological cut-off values (ECOFF) were used to evaluate the microbiological resistance. The 83% of the isolated strains in turkeys had multiresistance (resistant to 3 or more antibiotics), compared to the 38% in broilers. In layers, multi-resistant strains were not detected. The resistance rates in turkeys were observed against Sulfomethoxazol (83%), Ciprofloxacin (83%), Tetracyclines (74%), Nalidixic acid (70%), Ampicillin (61%), Gentamicin (22%), Trimethoprim (13%) and Cefotaxime (13%). Against broilers resistance was detected to Sulfomethoxazole (87%), Gentamicin (47%), Ciprofloxacin (40%), Nalidixic acid (26%), Tetracyclines (24%), Trimethoprim (19%) and Ampicillin (15%). In layers, resistance was observed to Sulfomethoxazole (50%), Tetracyclines (13%), Colistin and Ampicillin (6%). These results suggest differences in *Salmonella* spp. antibiotic resistance depending on the poultry production. On the other hand, poultry production can be a potential source of resistant *Salmonella* strains transmission. For this reason, the establishment of monitoring systems and good sanitary practices previous antimicrobial application are necessary to decrease these rates and the propagation of resistant strains.

Keywords: *Salmonella*; Antimicrobial resistances; Antibiotics; Poultry; Broth microdilution method.

Introducción

Salmonella spp. es uno de los patógenos zoonóticos con mayor importancia en salud pública. Los últimos datos revelados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) muestran una tasa del 20,4% de casos de *Salmonella* por 100.000 personas, con un total de 94.530 brotes en la Unión Europea (UE) durante 2016 (Figura 1), siendo el segundo patógeno con más casos reportados después de *Campylobacter* (EFSA, 2017). La EFSA señala los alimentos de origen animal, en concreto los productos procedentes de la avicultura, como una de las principales vía de contagio en humanos (EFSA, 2017).

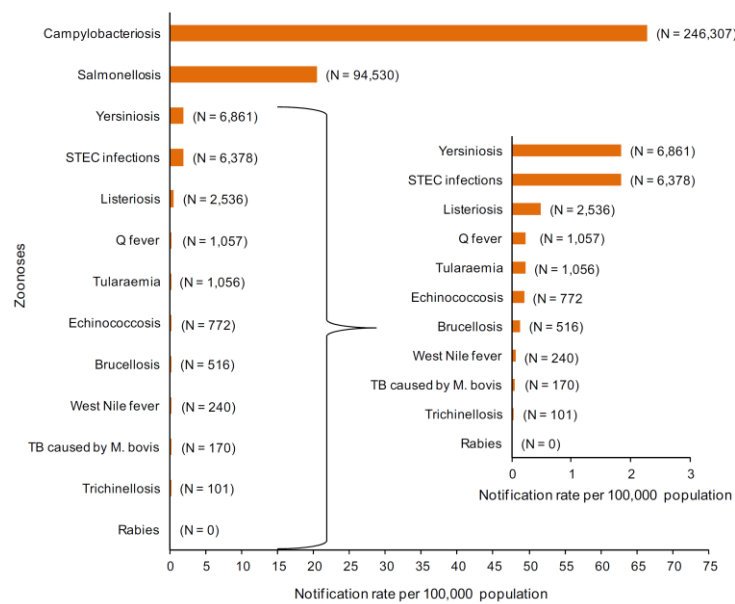


Figura 1. Casos notificados por 100.000 personas (EFSA, 2017).

Aunque la mayoría de casos de salmonelosis en humanos son autolimitantes y suelen resolverse sin necesitar tratamiento, en casos graves o pacientes inmunocomprometidos puede ser necesaria la terapia

con antibióticos (ciprofloxacina, (Berranget al., 2009), ampicilina y cloranfenicol (Miranda et al., 2006)).

Durante muchos años, los antibióticos han sido ampliamente utilizados, tanto en medicina humana como en veterinaria, no sólo para el tratamiento de enfermedades, sino también como preventivos y promotores del crecimiento. Así mismo, en varios países, se ha reportado también el empleo de antibióticos para tratar y prevenir enfermedades en plantas (Schnabel, E.L. et al., 1999).

La aparición de cepas resistentes a antibióticos de una serie de microorganismos patógenos, entre los que se incluye *Salmonella* spp., ha incrementado la preocupación en salud pública a nivel mundial, ya que el desarrollo de resistencias puede comprometer el tratamiento efectivo de infecciones en humana (Cook et al., 2009). Según el Plan Nacional de Resistencia de Antibióticos (PRAN) solo en España, se producen más de 2.500 muertes anuales debido a infecciones con cepas resistentes (PRAN, 2017).

En la UE, los estados miembros están obligados a controlar e informar sobre la resistencia a antibióticos en *Salmonella* y *Campylobacter* aisladas a partir de animales y alimentos (EFSA, 2018). Monitorizar las resistencias a antibióticos de las cepas aisladas, es esencial para proporcionar información sobre la magnitud del problema y las tendencias de resistencias en nuestro país.

El objetivo de este estudio fue evaluar el patrón de resistencias en 117 cepas aisladas en los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* (PNCS) en granjas de pollos, pavos y ponedoras durante el año 2017 en la Comunidad Valenciana frente a los 14 antibióticos establecidos en la Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos, mediante la técnica de susceptibilidad antimicrobiana basada en la técnica de microdilución en caldo.

Material y Métodos

Un total de 117 cepas fueron analizadas en este estudio, aisladas de muestras de calzas y heces en los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* (PNCS) en granjas de pollos (78 cepas), pavos (23 cepas) y ponedoras (16 cepas) durante el año 2017 en la Comunidad Valenciana. Todas las muestras tomadas durante el estudio fueron analizadas en el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV). El aislamiento e identificación de las cepas de *Salmonella* spp. fueron realizadas en 2017 y las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos durante el primer trimestre de 2018.

Detección de *Salmonella* spp. mediante método microbiológico de cultivo

Las muestras fueron analizadas mediante el método ISO 6579:2002 (Anexo D). En primer lugar, las muestras fueron preenriquecidas 1:10 vol/vol en agua de peptona tamponada 2,5% (BPW, Oxoid, Madrid, Spain) e incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. Después de la incubación, las muestras preincubadas fueron transferidas a placas de Agar Rappaport Vassiliadis modificado semisólido (MSRV, bioMérieux, Barcelona, Spain), e incubadas a $41,5\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas. El crecimiento obtenido en MSRV fue sembrado en Xylosa-Lysina-Desoxycholato (XLD, Oxoid, Madrid, Spain) y en placas de AES *Salmonella* Agar Plate (ASAP, bioMérieux, Barcelona, Spain), e incubado a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Después de la incubación, 5 colonias típicas fueron sembradas mediante la técnica de siembra en masa en superficie a placas de Agar nutritivo sólido y semisólido (Biokar®, France) e incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas para realizar la confirmación bioquímica y el serotipado. A su vez, para la confirmación bioquímica de *Salmonella* spp se utilizó la galería API (API-20®, bioMérieux, Barcelona, Spain). Todas las cepas aisladas fueron serotipadas siguiendo el esquema de Kauffman-White-Le Minor.

Las cepas de *Salmonella* aisladas se mantuvieron en congelación a -80°C en una suspensión de agua destilada estéril al 20% vol/vol de glicerol bidestilado al 99,5% (VWR, Leuven, Bélgica).

Evaluación de susceptibilidad antimicrobiana mediante microdilución en caldo

Las cepas de *Salmonella* spp. se analizaron mediante la técnica de microdilución en caldo por medio de placas Sensititre™ (Thermo Scientific, Santa Fe Drive, USA).

Para la recuperación de las cepas congeladas se procedió a resembrar con asa de siembra 5µL de la suspensión congelada en Agar nutritivo (Biokar®, France). Posteriormente se incubaron a 37±1°C durante 24±3 horas.

Tras el crecimiento de las cepas resembradas, se procedió a realizar un inóculo tomando de 3 a 5 colonias aisladas (de cultivo joven de 24-48 horas), emulsionándolas en 5mL de agua desmineralizada (Thermo Scientific, Santa Fe Drive, USA) ajustando el inóculo a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. Posteriormente se transfirieron 10µL de la suspensión anterior a un tubo de 11mL de caldo Mueller-Hinton (Thermo Scientific, Santa Fe Drive, USA), y se homogeneizó la mezcla mediante vorteo o inversión del tubo 8-10 veces. Para inocular la placa Sensititre™ se transfirieron 50µL de la suspensión anterior a cada pocillo manualmente mediante pipeta multicanal. Por último, se selló la placa con una lámina adhesiva, asegurando que todos los pocillos quedaban cubiertos y sellados. Se incubaron las placas en aerobiosis a 37±1°C durante 24±3 horas.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se procedió a la lectura de las placas de forma manual sin retirar la lámina adhesiva. Se interpretó como crecimiento (resistencia) aquellos pocillos en los que se observó turbidez (0,5 en la escala de McFarland) o depósito de células en el fondo de pocillo, y ausencia de crecimiento (sensible) aquellos pocillos en los que no se observaron ni turbidez ni células en el fondo.

Para determinar la resistencia frente a los antibióticos analizados se tomaron los valores de corte epidemiológico (ECOFF) marcados por la Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, establecidos por el EUCAST, sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos. Se utilizó la cepa *Salmonella* CECT 4300 como control de calidad positivo.

Resultados y Discusión

Durante este estudio, se analizaron 117 cepas de tres orientaciones productivas, pavos (23), pollos (78) y ponedoras (16) para determinar la susceptibilidad a 14 antibióticos de importancia para la salud humana y veterinaria. Cabe destacar que, de todas ellas, el 94% presentó susceptibilidad frente a 1 antimicrobiano (23 en pavos, 76 en pollos y 11 en ponedoras).

Un 83% de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas en pavos presentaron multirresistencias (entendiendo multirresistencia como resistente a 3 o más antibióticos), frente a un 38% en pollos. En ponedoras no se aislaron cepas multirresistentes (Figura 2). Estos resultados sugieren que existen diferencias de resistencia antibiótica en *Salmonella* spp. dependiendo de la orientación productiva avícola. El porcentaje de cepas multirresistentes es menor que la observada en estudios similares en pollos (100% de cepas resistentes; Álvarez et al., 2011).

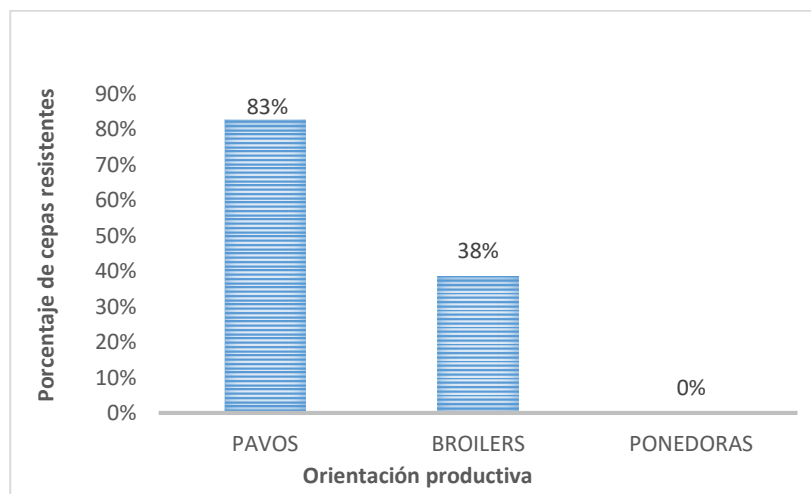


Figura 2. Porcentaje de cepas multirresistentes en las diferentes orientaciones productivas.

La distribución del número de cepas de *Salmonella* que fueron resistentes puede observarse en la figura 3. De las 23 cepas aisladas en pavos, el 35% fueron resistentes a 6 antibióticos, el 13% a 5, el 22% a 4 y el 13% a 3. Tan sólo el 17% presentó resistencias menores a 3 antibióticos. En pollos el 1% presentó resistencia a 8 antibióticos, el 3% a 6, el 14% a 5, el 8% a 4, el 13% a 3. El 59% presentó resistencias a menos de 3 antibióticos. Sin embargo, en ponedoras, el 69% presentó resistencias menores a 3 antibióticos, y el 31% fue sensible a los 14 antimicrobianos estudiados.

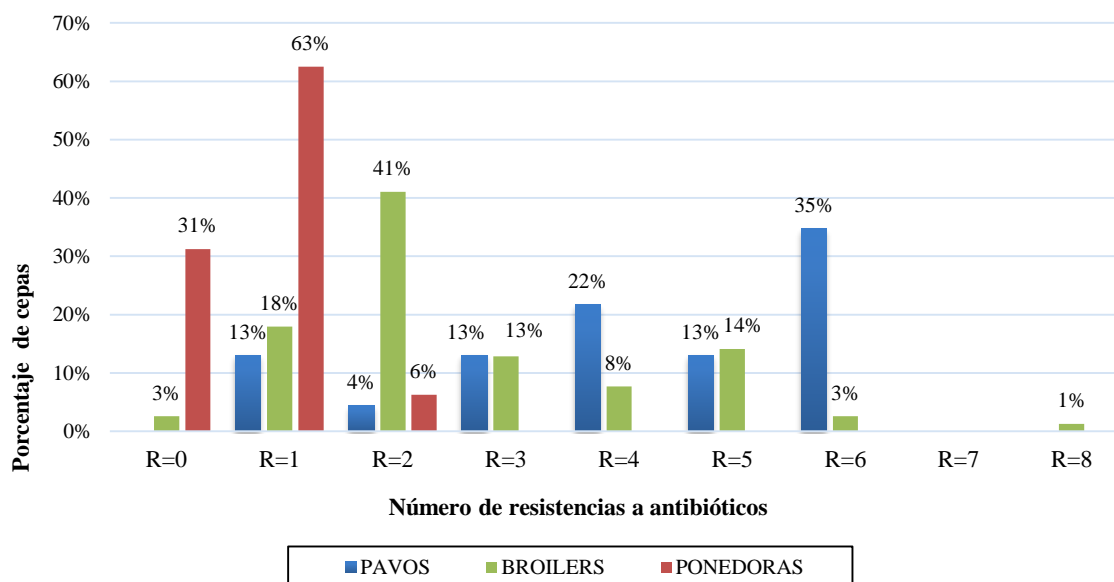


Figura 3. Distribución de las cepas de *Salmonella* en relación al número de antibióticos a los que presentaron resistencia.

El número promedio de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes fue menor en ponedoras (0,75) y en pollos (2,65) que en pavos (4,22), en contraste con otros estudios, donde el promedio fue del 3,9 y 5,98 en pollos durante 1993 y 2006, respectivamente (Álvarez et al., 2011), lo que nos muestra una tendencia a baja del número de antibióticos a los que las cepas de *Salmonella* son resistentes.

El resumen de las tasas de resistencias frente a los 14 antibióticos utilizados en el estudio puede verse en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de resistencias a antimicrobianos en diferentes orientaciones productivas.

Orientación productiva	N° cepas	Antimicrobianos													
		Número de cepas resistentes (% cepas resistentes)													
		SMX	TMP	CIP	TET	MERO	AZI	NAL	FOT	CHL	TGC	TAZ	COL	AMP	GEN
Pavos	23	19 (83)	3 (13)	19 (83)	17 (74)	0 (0)	0 (0)	16 (70)	3 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (61)	6 (22)
Pollos	78	68 (87)	15 (19)	31 (40)	19 (24)	1 (1)	1 (1)	20 (26)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	12 (15)	37 (47)
Ponedoras	16	8 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6)	1 (6)	0 (0)

SMX: Sulfametoxazol; TMP: Trimetoprim; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; MERO: Meropenem; AZI: Azitromicina; NAL: Nalidíxico; FOT: Cefotaxima; CHL: Cloranfenicol; TGC: Tigeciclina; TAZ: Ceftazidima; COL: Colistina; AMP: Ampicilina; GEN: Gentamicina.

En pavos se observaron resistencias a: Sulfometoxazol (83%), Ciprofloxacina (83%), Tetraciclinas (74%), Ácido Nalidíxico (70%), Ampicilina (61%), Gentamicina (22%), Trimetoprim (13%) y Cefotaxima (13%). En pollos se detectaron resistencias frente a Sulfometoxazol (87%), Gentamicina

(47%), Ciprofloxacina (40%), Ácido Nalidíxico (26%), Tetraciclinas (24%), Trimetoprim (19%) y Ampicilina (15%). Y en ponedoras se observaron resistencias frente a Sulfometoxazol (50%), Tetraciclinas (13%), Colistina y Ampicilina (6%) (Figura 4).

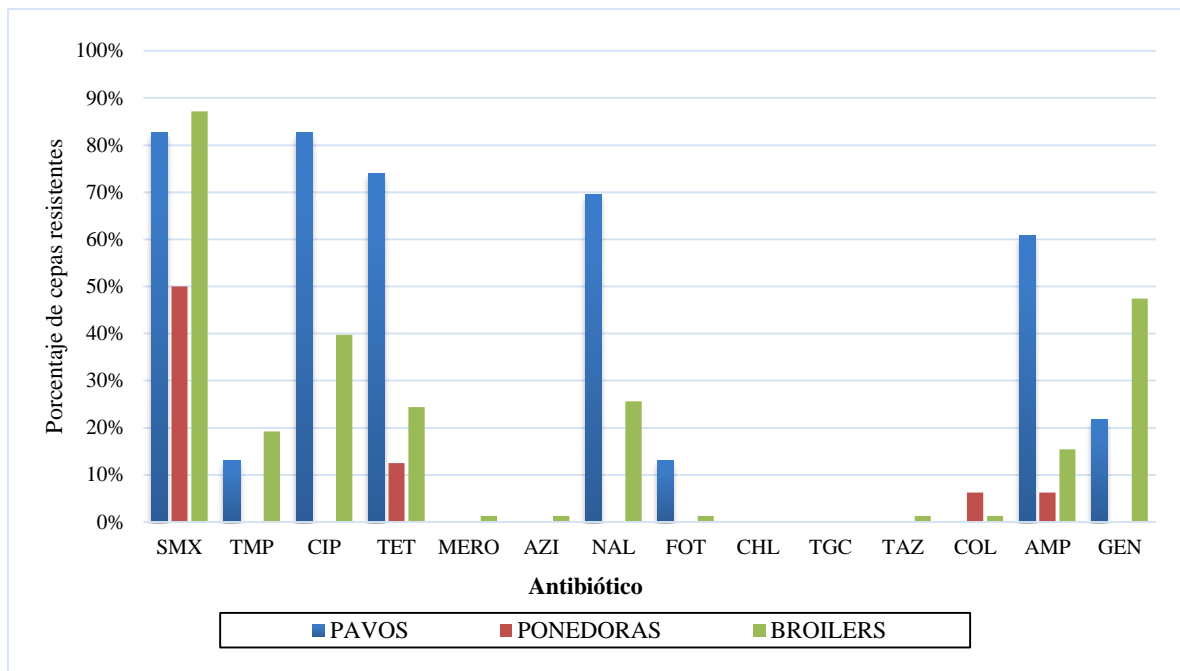


Figura 4. Porcentaje de cepas de *Salmonella* resistentes a los antibióticos estudiados.

Los antibióticos que presentaron incidencia media más alta de resistencias a medicamentos en las tres orientaciones fueron Sulfametoxazol (73%), Tetraciclinas (37%) y Ampicilina (27%).

En relación a los patrones de multiresistencias predominantes, en pavos fue SMX/CIP/TET/NAL/AMP/GEN en 5 cepas; en pollos SMX/TMP/CIP/TET/NAL en 9 cepas y SMX/CIP/GEN en 4 cepas. La alta incidencia de la combinación de resistencias observada, podría ser indicativa de la presencia de sistemas de transferencia génica, como plásmidos conjugativos bacterianos o elementos transponibles, portadores de genes que confieren resistencia a estos antimicrobianos (Capita et al., 2007).

Estos hallazgos confirman que las aves de corral son un importante reservorio de cepas de *Salmonella* resistente, y sugieren que existen diferencias significativas entre orientaciones productivas, siendo los pavos la orientación que mayores resistencias presenta, seguido de los pollos.

Se sabe que el uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos genera resistencia en patógenos y bacterias comensales (Capita et al., 2007). Por tanto, el hallazgo de altas tasas de resistencia o multiresistencia en cepas de *Salmonella* en este estudio, y en otros previos a nivel mundial, sugiere que sigue realizándose un alto uso de antimicrobianos en las orientaciones productivas con mayores resistencias. Cabe destacar, que en pollos se aisló una cepa resistente a 8 antibióticos. Teniendo en cuenta otros estudios a nivel de España (Álvarez et al., 2011) donde se halló una cepa resistente a 13 antibióticos, y a nivel mundial (Yang et al., 2010) donde el 28% de las cepas aisladas en pollos fueron resistentes a 9 o más antimicrobianos, podemos decir que el nivel de multiresistencias se ha reducido a nivel de la Comunidad Valenciana, aunque sigue siendo alta hallándose varias cepas en este estudio resistentes hasta a 6 antimicrobianos.

La ciprofloxacina, ampicilina y cloranfenicol han sido durante décadas los medicamentos de elección en el tratamiento de la salmonelosis humana (Berrang et al., 2009; Miranda et al., 2006). En los resultados obtenidos, se observaron altas tasas de resistencia a ciprofloxacina en cepas aisladas en pavos (83%) y el 40% en pollos. En relación a la ampicilina, se obtuvieron resistencias del 61%, 15% y 6% en pavos, pollos y ponedoras respectivamente, pudiendo complicarse el tratamiento en una infección causada por estas cepas. En un reciente informe del PRAN, la correlación entre el consumo de antibióticos y los porcentajes de resistencias es máxima en el caso animal comparado con animal y

mínima entre animal comparado con personas. Sin embargo, dichas correlaciones no indican necesariamente causa-efecto, siendo clave la reducción en el consumo de antibióticos para disminuir las resistencias en el mismo conjunto poblacional, personas o animales. Aunque en menor medida, la reducción del uso de antibióticos en medicina veterinaria tendrá efectos beneficiosos sobre los porcentajes de resistencias en bacterias aisladas de personas (PRAN, 2018). La ausencia de resistencias al cloranfenicol podría atribuirse a la falta de uso en producción animal (Álvarez et al., 2011).

Los resultados de este estudio confirman que la producción avícola puede ser una fuente potencial de transmisión de cepas de *Salmonella* spp. resistentes. Por ello se destaca la necesidad de encontrar estrategias de producción sin antibióticos, el desarrollo de terapias alternativas, el establecimiento de sistemas de monitoreo previa aplicación de antibióticos y las buenas prácticas sanitarias para disminuir las tasas de resistencias y minimizar la propagación de cepas resistentes.

Bibliografía

- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E., ALONSO-CALLEJA, C., GARCÍA-FERNÁNDEZ, C., CAPITA, R.** (2012) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from Poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology* **153**, 281–287.
- BERRANG, M.E., BAILEY, J.C., ALTEKRUSE, S.F., SHAW, W.K., PATEL, B.L., MAINERSMANN, R.J., FEDORKA-CRAY, P.J.** (2009) Prevalence, serotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* on broiler carcasses postpick and postchill in 20 U.S. processing plants. *Journal of Food Protection* **72**, 1610–1615.
- CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C., PRIETO, M.** (2007) Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1366–1375.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA).** (2017) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;**15**(12):5077.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA).** (2018) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal* 2018;**16**(2):5182.
- ISO 6579:2002** (Anexo D). (2002) «Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.» International Organization for Standardization. Ginebra, Suiza.
- MIRANDA, J.M., MONDRAGÓN, A.C., MARTÍNEZ, B., GUARDDON, M., RODRÍGUEZ, J.A.** (2009). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of Food Protection* **72**, 966-971.
- PLAN NACIONAL DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICOS (PRAN).** (2018), Informe JIACRA España. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. <http://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-jiacra-espana>.
- REZA SODAGARI, H., MASHAK, Z., GHADIMIANAZA A.** (2015) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2015; **9**(5):463-469.
- YANG, B., QU, D., ZHANG, X., SHEN, J., CUI, S., SHI, Y., XI, M., SHENG, M., ZHI, S., MENG, J.,** (2010) Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International Journal of Food Microbiology* **141**, 63-72.