

Detección fenotípica y molecular de enterobacterias portadoras de betalactamasas de espectro extendido en granjas lecheras de Querétaro con sistemas de ordeño manual y automatizado

J.L. Hernández-Lara, A. Oropeza-Urbano, C.A. Becerra-Cerezo, H. Rodulfo, M. De Donato
Tecnológico de Monterrey, Campus Querétaro. A01701437@itesm.mx

RESUMEN: Enterobacterias productoras de BLEE en alimentos representan un serio problema en salud pública. Este estudio plantea investigar presencia de enterobacterias portadoras de BLEE en dos granjas lecheras de Querétaro con sistema de ordeño automatizado y semiautomatizado. Se tomaron muestras aleatorias de leche de vacas en ambas granjas, así como filtros del sistema de recolección de leche. Se detectaron cepas productoras de BLEE usando Chromagar ESBL, los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* por PCR y la caracterización molecular por ERIC-PCR para determinar su relación clonal. Las frecuencias de cepas productoras de BLEE en la granja automatizada y en la semiautomatizada fueron de 30,76% y 36,36%, respectivamente. El gen *bla_{CTX-M}* fue el más frecuente (83,3%), seguido de *bla_{TEM}* (44,4%) y *bla_{SHV}* (11,1%). Los métodos moleculares fueron eficientes para identificación simultánea de 2 y 3 genes en una misma cepa (38,9% y 5,6%, respectivamente) siendo esto más frecuente en la granja semiautomatizada (60%), al igual que ahí fue mayor la variabilidad genética de los aislados. Podemos concluir que la presencia simultánea de genes de BLEE y la alta variabilidad en enterobacterias aisladas de leche, amerita aplicación de medidas de prevención y control en granjas de producción independiente de la automatización.

Palabras clave: Leche, enterobacterias, BLEE.

ABSTRACT: ESBL-producing Enterobacteria in food represent a serious problem in public health. This study proposes to investigate the presence of ESBL-producing Enterobacteria in two dairy farms located in the Querétaro state, using automated and semi-automated milking system. Random milk samples from individual animals in both farms, as well as filters from the milk collection system. The ESBL-producing strains were screen using Chromagar ESBL, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* genes were detected by PCR and molecular characterization was done by ERIC-PCR to determine their clonal relationship. The frequencies of ESBL-producing strains in the automated farm and in the semi-automated farm were 30.76% and 36.36%, respectively. The *bla_{CTX-M}* gene was the most frequent (83.3%), followed by *bla_{TEM}* (44.4%) and *bla_{SHV}* (11.1%). Molecular methods were efficient for simultaneous identification of 2 and 3 genes in the same strain (38.9% and 5.6%, respectively), being this more frequent in the semiautomatized farm (60%), as well as there the genetic variability was higher in the isolates We can conclude that the simultaneous presence of ESBL genes and the high variability of Enterobacteria isolated from milk, requires the application of prevention and control measures in production farms independent of automation.

Keywords: Milk, enterobacteria, ESBL.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

En diferentes países de Europa y Asia se han reportado enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en alimentos saludables producidos de animales [6, 12, 22] o en productos alimenticios como carne, pescado y leche cruda [14]. Recientemente, Wittum *et al.*, [23] y Doi *et al.*, [9] describieron por primera vez a los productores de BLEE en ganado lechero saludable y carne al menudeo en Estados Unidos. De igual forma en Sur América se reportan enterobacterias patógenas y con resistencia antimicrobiana en diferentes productos alimentarios de Brasil, Venezuela y Colombia, entre otros.

La posibilidad de transmisión de bacterias resistentes o sus determinantes de resistencia de los animales productores de alimentos a los seres humanos ha sido una preocupación en salud pública, y

en este sentido, las enterobacterias productoras de BLEE son en su mayoría insensibles a muchos de los antimicrobianos de uso común, además de que portan genes de resistencia pueden transferir fácilmente a otros patógenos, lo que lleva a la propagación de la resistencia a los fármacos [16].

Con respecto a estudios en México en ganado lechero solo se reportan investigaciones centradas a la búsqueda de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia* y *Staphylococcus*, comunes en este tipo de muestras [2, 17], siendo necesario en la actualidad conocer la importancia epidemiológica y clínica de diferentes bacterias productoras de BLEE en la cadena de procesamiento de alimentos o en el alimento de nuestro consumo diario que posiblemente provenga de animales de granja sanos, para poder tener un conocimiento real sobre el verdadero impacto de animales de granja sanos como posibles reservorios de bacterias portadoras o productoras de BLEE.

Por todo lo anteriormente expuesto, esta investigación plantea investigar aleatoriamente la presencia de enterobacterias portadoras de BLEE en dos granjas lecheras de Querétaro con sistema de ordeño automatizado y manual. Los resultados permitieron demostrar la presencia de diferentes enterobacterias portadoras de BLEE tanto en muestras de leche como en filtros de vacas sanas y vacas con mastitis en ambos sistemas de ordeño, lo que permite concluir la necesidad de aplicación este tipo de estudios como parte del esquema sanitario obligatorio que deben llevar las granjas lecheras para garantizar la inocuidad y calidad de sus productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron aleatoriamente muestras de leche de las vacas de granjas de producción con sistemas semi automatizado y automatizado, así como filtros de los sistemas de recolección de leche (aproximado de 44.500 litros de leche diarios). Todas las muestras fueron recolectadas en envases y bolsas estériles, tomando en cuenta las medidas higiénicas y de bioseguridad pertinentes. Las muestras fueron transportadas en frío hasta el Laboratorio de Biología Molecular del Tecnológico de Monterrey para su procesamiento.

Aislamiento e identificación de cepas

Todas las muestras de leche y filtros fueron colocadas en caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron 18 horas a 35°C. Transcurrido el tiempo, y confirmado el crecimiento por turbidez, se procedió a sembrar los aislados en CHROMagar™ ESB, incubando 18 horas a 35°C. Todas las colonias fueron confirmadas bioquímicamente mediante los protocolos de identificación convencionales para enterobacterias [18].

Reacción en cadena de la polimerasa para detección de BLEE

A todas las colonias que crecieron en el CHROMagar™ ESB se les realizó extracción del ADN genómico utilizando el estuche comercial de Wizard Genomic de Promega, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se detectaron los genes *bla_{SHV}* que amplifica 865 pb [13], *bla_{TEM}* de 859 pb [1] y *bla_{CTX}* de 544 pb [10]. Para ello, se utilizaron 0,15 µl de los oligonucleótidos (200 µmol/L), 7,5 µl de solución master mix 2x de Invitrogen y 1 µl de ADN para un volumen final de 15 µl. Se amplificaron los fragmentos con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 56°C (*bla_{SHV}*), 52°C (*bla_{TEM}*) y 60°C (*bla_{CTX}*) por 1 minuto, seguido de una extensión a 72°C por 1 minuto, durante 30 ciclos, con una extensión final de 72°C por 10 minutos. Como control positivo, para los tres genes se empleó la cepa ATCC de *K. pneumoniae* 77915.

Tipificación por secuencias consenso intergénicas repetitivas en enterobacterias

Se utilizaron los iniciadores: ERIC-1 y ERIC-2, preparando una mezcla de reacción con un volumen final de 15 µl que contenía 0,40 µl de cada oligonucleótido (200 µmol/L), 0,15 µl de dNTP'S (100 mol/L) 0,9 µl MgCl₂ (25 mmol/L), 3 µl de buffer 5X, 0,12 µl de goTaq polimerasa (5U/µl) y 1 µl de

ADN genómico [21]. Para la amplificación se utilizó 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 45°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2:30 minutos, finalmente, una extensión final a 72°C por 10 minutos. La interpretación de los patrones de bandas generados por ERIC-PCR se realizó basándose en los criterios establecidos por [20], considerando diferentes aquellas cepas que mostraron, al menos, una banda de diferencia.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados por PCR fueron corridos en gel de agarosa al 2%, en buffer TBE 1X a 80 voltios durante dos horas. Para estimar los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados, se utilizó un marcador de peso molecular (100 pb de Promega y 1Kb de Hyperladder plus). Los geles fueron coloreados con GelRed (10 000X). Los productos amplificados fueron analizados un iBright CL1000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las frecuencias de enterobacterias portadoras de BLEE en la granja automatizada y en la semiautomatizada fueron de 30,76% y 36,36% respectivamente. Al amplificar por PCR se obtuvo que el gen *bla*_{CTX-M} fue el más frecuente 83,3%, seguido de *bla*_{TEM} (44,4%) y *bla*_{SHV} (11,1%), tal como se muestra en la figura 1.

Los métodos moleculares fueron más eficientes para identificación simultánea de 2 y 3 genes en una misma cepa (38,9% y 5,6% respectivamente), tal como se puede evidenciar en la figura 2 en donde se muestran los diferentes productos amplificados de los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, y *bla*_{SHV} en las enterobacterias evaluadas, siendo más frecuente estos múltiples

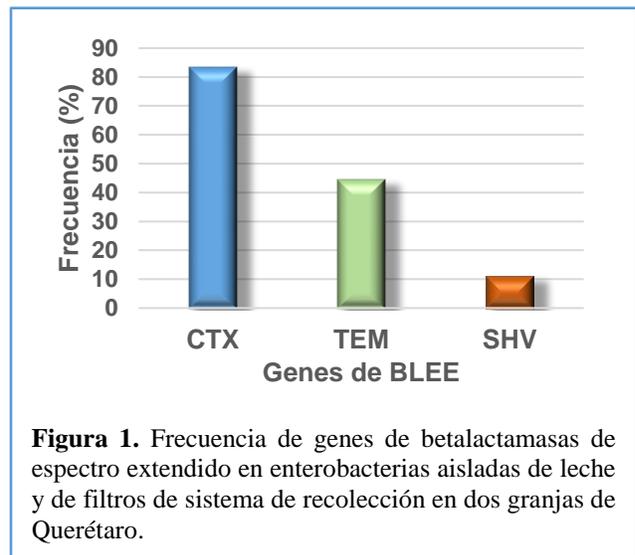


Figura 1. Frecuencia de genes de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de leche y de filtros de sistema de recolección en dos granjas de Querétaro.

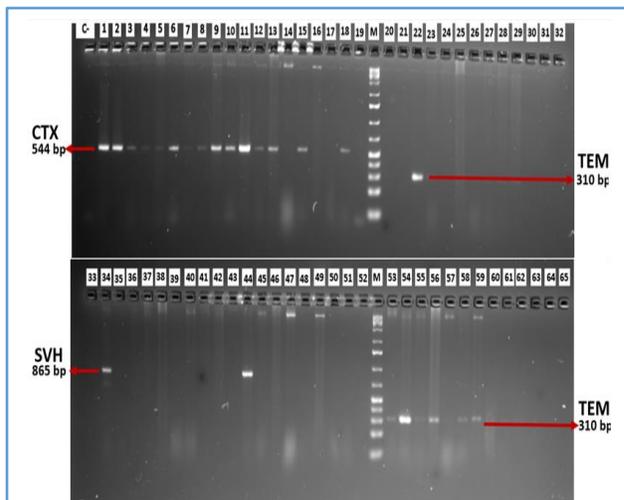


Figura 2 Amplificación por PCR de genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, y *bla*_{SHV} de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de leche y de filtros de sistema de recolección en dos granjas de Querétaro.

genes en granja semiautomatizada (60%)

Estos resultados se relacionan con otros estudios que reportan mayor frecuencia de BLEE asociada a los tres genes evaluados en este estudio, siendo *bla*_{CTX-M} el más frecuente. Esto ha originado un incremento en los estudios realizados en diferentes países describiendo la prevalencia y características de BLEE que producen enterobacterias en el ganado bovino [3, 15, 23, 19] y en leche cruda [14] por variaciones geográficas de diferentes variantes de ESBL [4], lo que resalta la importancia de este primer estudio realizado en Querétaro sobre frecuencia y tipos de BLEE en enterobacterias de leche.

La explicación a la elevada frecuencia de BLEE podría ser el uso de betalactámicos e incluso cefalosporinas de cuarta generación en medicina veterinaria [5], y otra razón podría ser

una co-selección de múltiples mecanismos de resistencia a través del uso de diversos antibióticos, debido al hecho de que los genes de resistencia de BLEE se encuentran con frecuencia en plásmidos conjugativos individuales [4, 11].

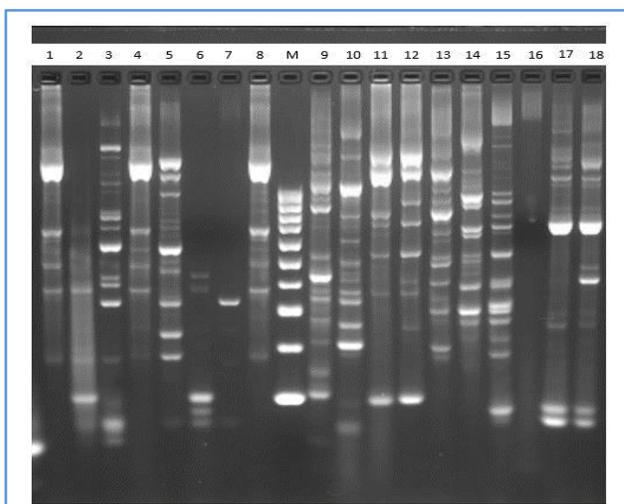


Figura 3 Tipificación por ERIC PCR de Enterobacterias portadoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de leche y de filtros de sistema de recolección en dos granjas de Querétaro.

En cuanto a la tipificación molecular (Figura 3) de las cepas de enterobacterias aisladas de la granja automatizada se identificaron 6 genotipos (pozos 1-8), de los cuales uno de ellos se aisló tanto en leche como en filtros (pozos 1,4 y 8), mientras que en la granja semiautomatizada se identificaron 9 genotipos (pozos 9 al 18) que demuestran la variabilidad genética de esos aislados de enterobacterias.

En esta investigación la ERIC-PCR fue capaz de discriminar los aislados, revelando la diversidad genética de los aislados, que también se ha observado en otros estudios [6, 12] y podría ser debida a elementos genéticos y diseminación de genes

La presencia de enterobacterias portadoras de BLEE en leche podría ser motivo de preocupación, ya que las bacterias patógenas resistentes o genes pueden entrar en la cadena

alimenticia causando infección a consumidores, además reitera la necesidad de una planificación, vigilancia e implementación de un mejor control de infecciones y medidas preventivas con uso racional de antimicrobianos en alimentos y animales para alcanzar una solución sostenible.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aarestrup, F. M., Lertworapreecha, M., Evans, M. C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R. S., & Wegener, H. C. (2003). Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 715–718. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg426>
- [2] BERNARDINO-VARO, L., QUIÑONES-RAMÍREZ, E. I., FERNÁNDEZ, F. J., & VÁZQUEZ-SALINAS, C. (2013). Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Raw Cow's Milk Collected from Stables of Mexico City. *Journal of Food Protection*, 76(4), 694–698. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-325>
- [3] Bradford PA, Petersen PJ, Fingerman IM, White DG: Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. *J Antimicrob Chemother* 1999, 44:607-610.
- [4] Cantòn R, Coque TM: The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006, 9:466-475.
- [5] Cavaco LM, Abatih , Aarestrup FM, Guardabassi L: Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:3612-3616.
- [6] Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, López C, Andreu A, Navarro F, Alonso MP, Bou G, Blanco J, Llagostera M: Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76:2799-2805.
- [7] Cueto, C., García, D., Garcés, F., & Cruz, J. (n.d.). Preliminary studies on the microbiological characterization of lactic acid bacteria in suero costeño, a Colombian traditional fermented milk product. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49(1–2), 12–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18693547>
- [8] de Campos, A. C. L. P., Puño-Sarmiento, J. J., Medeiros, L. P., Gazal, L. E. S., Maluta, R. P., Navarro, A., ... Nakazato, G. (2018). Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(2), 94–100. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2345>

- [9] Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZH, Sidjabat HE, Rodriguez-Bano J: Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect* 2010, 16:33-38
- [10] Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., & Strachounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3724–3732. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638473>
- [11] Gniadkowski M: Evolution and epidemiology of extended-spectrum betalactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001, 7:597-608
- [12] Gonçalves A, Torres C, Silva N, Carneiro C, Radhouani H, Coelho C, Araújo C, Rodrigues J, Vinué L, Somalo S, Poeta P, Igrejas G: Genetic characterization of extended-spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm. *Foodborne Pathog Dis* 2010, 7:1569-1573.
- [13] Galani, I., Xirouchaki, E., Kanellakopoulou, K., Petrikkos, G., & Giamarellou, H. (2002). Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(9), 579–588. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427218>
- [14] Hammad AM, Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T: First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. *J Vet Med Sci* 2008, 70:1269-1272.
- [15] Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, Duncan D, Rabie A, McLaren I, Watson E, La Ragione RM, Coldham NG: Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: Implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol* 2011, 77:3715-3719.
- [16] Hu, Y., Yang, X., Li, J., Lv, N., Liu, F., Wu, J., ... Zhu, B. (2016). The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22), 6672–6681. <https://doi.org/10.1128/AEM.01802-16>
- [17] Jiménez Mejía, R., Gudiño Sosa, L. F., Aguilar López, J. A., Loeza Lara, P. D., Jiménez Mejía, R., Gudiño Sosa, L. F., ... Loeza Lara, P. D. (2017). Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(4), 387. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4251>
- [18] Mac Faddin, J. F., Rondinone, S., & Giovannello, O. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. *Médica Panamerica*
- [19] Madec JY, Lazizzera C, Châtre P, Martin S, Lepage G, Ménard MF, Lebreton P, Rambaud T, Meunier D: Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. *J Clin Microbiol* 2008, 46:1566-1567.
- [20] Rakotonirina, H. C., Garin, B., Randrianirina, F., Richard, V., Talarmin, A., & Arlet, G. (2013). Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Antananarivo, Madagascar. *BMC Microbiology*, 13(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-85>
- [21] Reboli, A. C., Houston, E. D., Monteforte, J. S., Wood, C. A., & Hamill, R. J. (1994). Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2635–2640. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7852548>
- [22] Tian GB, Wang HN, Zou LK, Tang JN, Zhao Yw, Ye MY, Tang JY, Zhang Y, Zhang AY, Yang X, Xu CW, Fu YJ: Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal sample isolates from pig farms in China. *Foodborne Pathog Dis* 2009, 6:297-304.
- [23] Wittum TE, Mollenkopf DF, Daniels JB, Parkinson AE, Mathews JL, Fry PR, Abley MJ, Gebreyes WA: CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Path Dis* 2010, 7:1575-1579.